

Entwicklung eines amperometrischen Biosensors für Cyanid

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Lothar Rudolf Ketterer
aus Offenburg**

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 31.05.2010
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Keusgen
Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am 01.06.2010

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen für die Überlassung des interessanten Themas und das Bereitstellen ausgezeichneter Arbeitsbedingungen danken. Weiterhin danke ich ihm für das in mich gesetzte Vertrauen und das großzügige Ermöglichen des Ergänzungsstudiengangs Informatik.

Herrn Prof. Dr. Klebe sei gedankt, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung stellte. Ebenso möchte ich den Nebenfachprüfern, Frau Prof. Dr. Petersen und Herrn Prof. Dr. Kuschinsky, sowie Dr. Jan Kusterer als Protokollführer meinen Dank aussprechen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen, dass sie mich in jeder Lebenslage unterstützten und mir eine akademische Ausbildung ermöglichten.

Ich danke Dr. Elvira Belz und Holger Knieps für das Lektorat sowie viele Stunden mit anregenden Gesprächen wissenschaftlicher und trivialer Natur. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die restlichen Mitglieder der AG Keusgen, besonders Benjamin Barlen, Dr. Saikat Datta Mazumdar, Fernanda Lorek, Dr. Jan Kusterer, Dr. Anja Vogt, Gabriela Mielke, Floris van Elsäcker, Doru und Dr. Georgeta Vornicescu, Dr. Jarmila Jedelská-Keusgen sowie Sascha Schmidt für wertvolle Ratschläge und die Schaffung eines guten Arbeitsklimas. Anja und Gabriela sei zudem für die Durchführung der Gellektrophorese gedankt. Matthias Brauschke danke ich für das Ausführen der Cyanid-Analysen nach DIN und seine stetige Hilfe bei labortechnischen Fragestellungen. Florian Deisinger und Tina Kleinert gingen mir im Labor mit Fleiß und Interesse zur Hand.

Prof. Dr. Klebe danke ich zudem für die Möglichkeit, das S1-Labor mitsamt den Gerätschaften mitzubেনutzen. Weiterhin danke ich seiner Arbeitsgruppe für theoretische und praktische Hilfestellungen, allen voran Prof. Dr. Klaus Reuter, Dr. Holger Steuber, Dr. Jark Boettcher, Angela Scholz, Lydia Hartleben, Dr. Andreas Heine, Christian Hasewinkel, Cornelia Koch, Sven Siebler und Dr. Peter Block.

Frank Balzer sorgte für eine ausgezeichnete IT-Unterstützung und hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen. Erwin Schott half beim Aufbau der Messapparaturen. Dr. Monika Turek danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Rahmen einer Kooperation.

Die Studierenden Birgit Bayer, Sina Tadjerpisheh, Andrea Thomas und Lena Wende trugen im Rahmen von Praktika zu dieser Arbeit bei.

Ich danke meinen Freunden Jochen Link, Peter Hauser, Daniel Hörth, Christian Schröder und Aleš Verner für ihre moralische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich Nadine für ihre Liebe danken.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	15
1.1 Biosensoren	15
1.2 Elektrochemische Analyseverfahren	15
1.2.1 Grundlagen	15
1.2.2 Amperometrie	18
1.2.3 Cyclische Voltammetrie	22
1.2.4 Elektrochemische Quantifizierung von NADH	24
1.3 Cyanid	26
1.3.1 Eigenschaften	26
1.3.2 Verwendung	28
1.3.3 Herstellung	29
1.3.4 Cyanogene Glykoside	30
1.3.5 Enzyme mit Cyanid als Substrat	30
1.3.6 Toxizität	35
1.3.7 Therapie von Vergiftungen	36
1.3.8 Nachweis- und Bestimmungsverfahren ohne biologische Komponente	37
1.3.9 Kommerzielle Sensoren und Kits	39
1.3.10 Enzymatische und biosensorische Bestimmungsverfahren	40
1.4 Kompatible Solute	44
1.5 Zielsetzung der Arbeit	45
2 Material und Methoden	46
2.1 Bezugsquellen	46
2.2 Geräte	47
2.2.1 Potentiostat, Elektroden und Zubehör	47
2.2.2 Sonstige	48
2.3 Reagenzien	49
2.4 Enzyme	52

2.5	Lösungen	53
2.6	Fließinjektionsanalyse zur Ammoniak-Quantifizierung	55
2.7	Herstellung von Cyanidase	56
2.7.1	Herstellung von Agarplatten	56
2.7.2	Bakterienaufzucht	56
2.7.3	Bakterienaufschluss	57
2.7.4	Aufreinigung	57
2.7.5	Anlegen von Dauerkulturen	58
2.8	Charakterisierung von Cyanidase	58
2.8.1	Proteingehaltsbestimmung nach Lowry	58
2.8.2	Gravimetrische Proteingehaltsbestimmung	59
2.8.3	Aktivitätsbestimmung mittels FIA	59
2.9	Bestimmung der Aktivität von FDH	60
2.10	NHS-aktivierte Kartuschen	60
2.10.1	Enzymimmobilisierung	60
2.10.2	Umsatzrate Cyanidase-Kartusche	61
2.10.3	Umsatzrate FDH-Kartusche	61
2.11	Extraktion von Cyanid aus Pflanzenteilen	61
2.12	Cyanid-Quantifizierung - Standardmethode	62
2.12.1	König-Reaktion	62
2.12.2	Isolierung von Cyanid aus Matrices	62
2.13	Sensoraufbau	65
2.13.1	Enzymatischer Durchflusssensor	65
2.13.2	Gassensor	66
2.14	Chemische Modifizierung von Elektroden	66
2.14.1	Aufbringen von Berliner Blau	66
2.14.2	Adsorption von Meldolablauf nach elektrochemischer Vorbe- handlung	68
2.15	Bestimmung der Henry-Konstanten von Blausäure	68
2.16	Sicheres Arbeiten mit Cyanid	69
2.16.1	Einwiegen und Lösen	69
2.16.2	Entsorgung	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Gewinnung und Charakterisierung von Cyanidase	70
3.1.1	Proteingehalt und Aktivität	70
3.1.2	Verifizierung der Methode zur Proteingehaltsbestimmung . . .	70
3.1.3	Enzymkinetik	71
3.1.4	Stabilität	75
3.1.5	Reinheit	77
3.2	Aktivität der Formiatdehydrogenase	78

3.3	Durchflusssensor mit direkter Formiatdetektion	79
3.3.1	Pt-Elektrode, modifiziert mit Berliner Blau und Polypyrrol	79
3.3.2	Cyanidtoleranz	84
3.3.3	Komplexieren des nicht hydrolysierten Cyanids	86
3.4	Durchflusssensor mit Enzymkaskade und Bestimmung von NADH	91
3.4.1	Vorwort	91
3.4.2	Auswahl der Elektrode	91
3.4.3	Enzymkartuschen	91
3.4.4	Optimale NAD ⁺ -Konzentration	92
3.4.5	Beweis des Prinzips	93
3.4.6	Signalstabilität	94
3.4.7	Linearer Bereich	97
3.4.8	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	99
3.4.9	Störungen	101
3.4.10	Realproben	103
3.4.11	Lagerstabilität	109
3.5	Gassensor	112
3.5.1	Vorwort	112
3.5.2	Henry-Konstante	113
3.5.3	Möglicher Potentialbereich von Cyanidase und FDH	114
3.5.4	Erweiterung des Formiat-Sensors von Sandström	114
3.5.5	Fixierung der Mischung mit Papier	122
3.5.6	Luftdurchfluss	123
3.5.7	Adsorption von Meldolablauf an Elektroden	126
3.5.8	Meldolablauf-Adsorption nach elektrochemischer Vorbehandlung	126
3.5.9	Benzochinonderivate als Mediator	131
3.5.10	Signal bei Wasserzugaben	135
3.5.11	Feste Säure	140
3.5.12	Großes Säurevolumen, Temperaturkorrelation	143
3.5.13	Gleichzeitige Blindmessung	144
3.5.14	Kaliumhexacyanidoferrat als Mediator	150
4	Diskussion	156
4.1	Am Sensoraufbau beteiligte Enzyme	156
4.1.1	Cyanidase	156
4.1.2	Formiatdehydrogenase	158
4.2	Enzymatischer Sensor mit Detektion von Formiat	158
4.3	Verhalten von Elektrodenchips im Gasraum	160
4.3.1	Allgemeine Betrachtungen	160
4.3.2	Detektion von Cyanid über Enzymkaskade und Mediator	164
4.4	Nebenreaktionen	166
4.5	Mediatoren	168

4.6	Abschließende Bewertung der Versuche zum Gassensor	169
4.7	Durchflusssensor mit Detektion von NADH	169
4.7.1	Besonderheiten und Probleme	169
4.7.2	Vergleich mit anderen Cyanidsensoren	172
4.7.3	Abschließende Bewertung des Durchflusssensors	173
4.8	Ausblick	174
5	Zusammenfassung	175
	Eigene Veröffentlichungen	177
	Literaturverzeichnis	178
	Lebenslauf	193

Tabellenverzeichnis

1.1	Umsatzraten von Proteinen mit Cyanidase-Aktivität	33
1.2	Charakteristika existierender Enzym- und Biosensoren für Cyanid . . .	43
2.1	Bezugsquellen	46
2.2	Verwendete Elektroden	48
2.3	Verwendete Geräte	48
2.4	Verwendete Chemikalien	50
2.5	Verwendete Lösungen	53
2.6	Pipettierschema Lowry	58
2.7	Pipettierschema Cyanid-Bestimmung	62
3.1	Enzymkinetische Parameter	72
3.2	Zusätze zu Cyanidase-Lösungen für Lagerversuch	75
3.3	Aktivität der FDH	78
3.4	Komplexbildungskonstanten einiger Cyanidokomplexe	86
3.5	Salze zur Herstellung von Metallion-Kartuschen	87
3.6	Umsatzraten in Abhängigkeit von der NAD ⁺ -Konzentration	93
3.7	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	101
3.8	Querempfindlichkeiten	103
3.9	6 Pflanzenextrakte, Ergebnis in mM	106
3.10	Ergebnis Kirschchlorbeerproben mit und ohne Cyanidisolierung	107
3.11	Kirschchlorbeerproben: Vergleich der Ergebnisse.	107
3.12	Ermittelte Henry-Konstanten	113
3.13	Vergleich von Signalthöhen bei verschiedenen Säurevolumina	120
3.14	Detaillierte Bedingungen bei Messungen im Gasraum	153

Abbildungsverzeichnis

1.1	Amperometrische Messaufbauten	19
1.2	Wall-Jet-Zelle	20
1.3	Schematische Strom-Spannungskurve	21
1.4	Elektrochemische Doppelschicht	21
1.5	Spannungsverlauf bei CV	22
1.6	Schema eines cyclischen Voltammogramms	23
1.7	NAD ⁺ /NADH	25
1.8	Meldolablauf	26
1.9	Strukturbeispiele CG	30
1.10	Freisetzung von HCN aus CG	31
1.11	Struktur der Cyanidase aus <i>P. stutzeri</i>	32
1.12	Ectoin und Hydroxyectoin	44
2.1	Elektrodenchip (W5)	49
2.2	Restriktionskarte Cyanidase-Plasmid	52
2.3	Aufbau FIA	55
2.4	FIA-Reaktion	56
2.5	Aufbau Umsatzrate FDH-Kartusche	61
2.6	König-Reaktion	63
2.7	Aufbau nach DIN 38405	64
2.8	Aufbau enzymatischer Durchflusssensor	65
2.9	Aufbauten für Biosensormessungen in der Gasphase	67
3.1	Proteingehalt nach Lowry bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen	71
3.2	Michaelis-Menten-Diagramm, Kinetik mittels FIA	73
3.3	Eadie-Hofstee, Kinetik mittels FIA	73
3.4	Michaelis-Menten-Diagramm, Kinetik mittels Farbbassay	74
3.5	Eadie-Hofstee, Kinetik mittels Farbbassay	74
3.6	Entwicklung der Aktivität einer im KS gelagerten Cyanidase-Lösung.	76
3.7	Entwicklung der Aktivität verschieden gelagerter Cyanidase-Lösungen.	77
3.8	SDS-PAGE zweier Cyanidase-Lösungen zu verschiedenen Zeitpunkten.	78
3.9	Schema Pt-Elektrode modifiziert mit PB, PPY, FDH und NAD	79
3.10	Chemisch modifizierte W2 - PB sowie NAD ⁺ und FDH in PPY	80
3.11	Chemisch modifizierte W2 - PB sowie NAD ⁺ in PPY (ohne FDH)	81
3.12	Chemisch modifizierte W2 - PB und PPY (ohne NAD ⁺ und FDH)	82

3.13 Chemisch modifizierte W2 - PB (kein PPY, NAD ⁺ , FDH)	82
3.14 Unbehandelte W2	83
3.15 Formiat und Cyanid in Flüssigkeit, Elektrode W5	84
3.16 W2 im Durchfluss - Ermittlung der optimalen Flussrate	85
3.17 W2 im Durchfluss - Formiatproben gespiked mit Cyanid	85
3.18 Schema Durchflusssystem Metallkartuschen	87
3.19 Pd ²⁺ zum Abfangen von Cyanid	88
3.20 Co ²⁺ zum Abfangen von Cyanid	89
3.21 Ni ²⁺ zum Abfangen von Cyanid	89
3.22 Pt ²⁺ zum Abfangen von Cyanid	90
3.23 CV mit NADH, Elektroden W4 und W5.	92
3.24 Schema Durchflusssystem zur Optimierung der NAD ⁺ -Konzentration	93
3.25 Bestimmung der optimalen NAD ⁺ -Konzentration	94
3.26 Überprüfung des Sensorprinzips - Durchflusssensor	95
3.27 Überprüfung des Sensors ohne Cyanidase-Kartusche	95
3.28 Signalstabilität	96
3.29 Elektrochemische Elektrodenregeneration	97
3.30 Überprüfung auf Linearität	98
3.31 Korrelation zwischen Peakfläche und Cyanidkonzentration.	98
3.32 Korrelation zwischen Peakhöhe und Cyanidkonzentration	99
3.33 Nachweis- und Bestimmungsgrenze, 1/2	100
3.34 Nachweis- und Bestimmungsgrenze, 2/2	100
3.35 Strukturen untersuchter Nitrile	101
3.36 Störungen, 1/2	102
3.37 Störungen, 2/2	102
3.38 Realprobe: Kirschchlorbeer	104
3.39 3 Bittermandel- und 3 Kirschchlorbeerproben	106
3.40 Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschchlorbeer, Sensogramm Enzymsensor, 1/3	108
3.41 Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschchlorbeer, Sensogramm Enzymsensor, 2/3	108
3.42 Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschchlorbeer, Sensogramm Enzymsensor, 2/3	109
3.43 Lagerstabilität zweier Elektrodenchips.	110
3.44 CV: Cyanidase und FDH	115
3.45 Chip mit Mischung	116
3.46 CV Meldolablauf	116
3.47 Gasphasenmessung, Meldolablauf	117
3.48 Überprüfung des Sensorprinzips - Gassensor	117
3.49 Reaktion auf unterschiedliche Cyanid-Mengen	118
3.50 Geringes Volumen Mischung auf Elektrode	119
3.51 Verschiedene Säurevolumina	119

3.52	Messung im Dreihalskolben, Säurekomponente H_2SO_4 dil.	121
3.53	Messung in Dreihalskolben mit H_2SO_4 dil. und Glycerol	121
3.54	Stellung des Elektrodenchips	122
3.55	Mischung auf Zigarettenpapier	123
3.56	Vergleich mit und ohne Zigarettenpapier	124
3.57	Flusszelle mit Luftfluss, 1/2	125
3.58	Flusszelle mit Luftdurchfluss, 2/2	125
3.59	CV nach Adsorption von MB	127
3.60	CME: Adsorption von MB	127
3.61	CV-Kontrolle: CME nach Nagy	128
3.62	Kolben mit Paddel in Gasraum	128
3.63	CME nach Nagy, Messungen bei -0,2 V	129
3.64	CME nach Nagy, Messungen bei -0,1 V	130
3.65	CV mit CME nach Messungen.	130
3.66	CME nach Nagy, Messung bei +0,2 V	132
3.67	CME nach Nagy, Messung bei +0,2 V, ohne Rührpaddel	132
3.68	Benzochinonderivate	133
3.69	CV: Chloranil-behandelte Elektrode (nicht elektrochem. vorbehandelt)	134
3.70	CV: Chloranil-behandelte Elektrode (elektrochemisch vorbehandelt)	134
3.71	Schema Pt-Elektrode modifiziert mit PB und PPY	135
3.72	Wechsel Kolben-Raumluft, Säurekomponente H_3PO_4 / KCl-Lsg.	136
3.73	Wechsel Kolben-Raumluft, versch. Säure- und Mischungskomponenten	137
3.74	Signal bei Zugabe von NaOH dil.	137
3.75	Reaktion auf Wasserzugabe, Elektrodentyp W2	139
3.76	Reaktion auf Wasserzugabe, Elektrodentyp W5	139
3.77	Reaktion auf Wasserzugaben bei verschiedenen Potentialen, Typ W5	140
3.78	Citronensäure als Säurekomponente	141
3.79	Citronensäure + Trocknungsmittel als Säurekomponente, 1/2	142
3.80	Citronensäure + Trocknungsmittel als Säurekomponente, 2/2	142
3.81	Temperaturkorrelation + hohes Säurevolumen	143
3.82	Hohes Säurevolumen	144
3.83	Gleichzeitige Blindmessung: Bestimmung von NADH bei 0,8 V	146
3.84	Gleichzeitige Blindmessung: MB als Mediator, 1/3	147
3.85	Gleichzeitige Blindmessung: MB als Mediator, 2/3	148
3.86	Gleichzeitige Blindmessung: MB als Mediator, 3/3	149
3.87	CV mit Hexacyanidoferrat-II	151
3.88	Gleichzeitige Blindmessung, Hexacyanidoferrat-III als Mediator, hohes Potential	152
3.89	Gleichzeitige Blindmessung, Hexacyanidoferrat-III als Mediator, mittleres Potential	152
4.1	Desaktivierung von MB (Reaktion mit Cyanid)	169

Abkürzungsverzeichnis

AE	<i>auxiliary electrode(s)</i> , Hilfselektrode(n)
BSA	bovines Serumalbumin, hier: Albumin Fraktion V aus Rinderserum
BST/C	Elektrodenchip 101 00 00 00 der Firma BST
CG	cyanogenes Glykosid, cyanogene Glykoside
CME	<i>chemically modified electrode</i> , chemisch modifizierte Elektrode
CV	cyclische Voltammetrie
DIN	Deutsches Institut für Normung
EC	Enzyme Commission
EIS	Elektrolyt-Isolator-Silizium
FDH	Formiatdehydrogenase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FIA	<i>flow injection analysis</i> , Fließinjektionsanalyse
Glc	Glucose
GS	Gefrierschrank
HSAB	<i>hard and soft acids and bases</i>
ID	Innendurchmesser
ISE	ionenselektive Elektrode
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, Internationale Union für reine und angewandte Chemie
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KS	Kühlschrank
LOD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LOQ	<i>limit of quantification</i> , Bestimmungsgrenze
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MB	Meldolablauf
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid (allgemein)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
OPA	o-Phthaldialdehyd
PB	Preußisch Blau (synonym Berliner Blau)
PPY	Polypyrrol
RCF	<i>relative centrifugal force</i> , Relative Zentrifugalbeschleunigung
RE	<i>reference electrode(s)</i> , Referenzelektrode(n)
rekomb.	rekombinant

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Supr.	Suprapur
TBME	tert-Butylmethylether
VT	Volumenteile
W2	Elektrodenchip AC1.W2.R1 der Firma BVT
W4	Elektrodenchip AC1.W4.R1 der Firma BVT
W5	Elektrodenchip AC1.W5.R1 der Firma BVT
WE	<i>working electrode(s)</i> , Arbeitselektrode(n)
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Biosensoren

Laut Definition der Internationalen Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC) handelt es sich bei einem Biosensor um ein analytisches System mit einem biologischen Erkennungselement (Englisch: *receptor*) und einem physikochemischen Signalwandler (Englisch: *transducer*), der das biochemische Signal in ein elektrisches Signal überführt. Um der Definition zu genügen, müssen Erkennungselement und Signalwandler in direktem räumlichen Kontakt stehen [TTDW99].

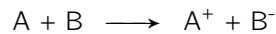
Dieses Prinzip wurde erstmals im Jahre 1962 von Clark und Lyons zur Messung von Glucose angewendet, indem sie den Sauerstoffverbrauch bei Umsatz von Glucose durch das Enzym Glucoseoxidase mit einer Sauerstoffelektrode bestimmten [CL62]. Die Entwicklung der dafür eingesetzten Sauerstoffelektrode im Jahre 1956, ebenfalls durch Clark, gilt als Geburtsstunde der Biosensorik [Cla56].

In der Folge wurden zahlreiche weitere Biosensoren konstruiert, die Enzyme, Antikörper, DNA, Lektine oder ganze Zellen als biologisches Element und beispielsweise elektrochemische oder optische Systeme als physikochemische Komponente beinhalten. Unter anderem in diesem Zusammenhang werden in Kapitel 1.3.5 Enzyme vorgestellt, die Cyanid als Substrat akzeptieren. Kapitel 1.2.4 geht auf die elektrochemische Bestimmung der reduzierten Form von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) als Cosubstrat vieler Enzyme ein. Kapitel 1.3.10 schließlich beschreibt existierende enzymatische und biosensorische Verfahren zur Bestimmung von Cyanid. Für weitere Informationen über Biosensoren sei auf die Literatur verwiesen. Einen guten Überblick geben Keusgen [Keu02], Scheller et al. [SWWL01] sowie Nakamura und Karube [NK03]. Vor der Betrachtung spezieller Anwendungen soll nun zunächst eine kurze allgemeine Einführung in elektrochemische Analyseverfahren erfolgen.

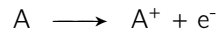
1.2 Elektrochemische Analyseverfahren

1.2.1 Grundlagen

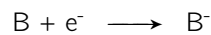
Elektrochemische Analyseverfahren machen sich zunutze, dass die Übertragung von Elektronen bei einer Redoxreaktion nicht nur direkt von Reaktionspartner zu Reaktionspartner, sondern auch vermittelt über elektrische Leiter stattfinden kann. Eine Redoxreaktion der Form



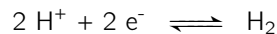
kann unter getrennter Betrachtung der beiden Redoxpaare in zwei Teilreaktionen zerlegt werden. Dies sind die Oxidation



und die Reduktion



Die Teilreaktionen können räumlich getrennt an so genannten Elektroden stattfinden. Als Elektroden werden in Elektrolytlösungen oder andere Medien eingebrachte elektrische Leiter bezeichnet. Es existieren je nach Beschaffenheit des Leiters und der Zusammensetzung der Lösung unterschiedliche Arten von Elektroden. Ein Metallstab, der in eine Lösung mit Ionen des gleichen Metalls taucht, wird als Elektrode 1. Art bezeichnet. An dieser so genannten elektrochemischen Halbzelle bildet sich ein Einzelpotential E aus, das allerdings nicht direkt gemessen werden kann. Es kann nur die Differenz der Einzelpotentiale zweier Halbzellen durch stromlose Messung bestimmt werden. Um dennoch absolute Werte angeben zu können, wurde das Potential einer bestimmten elektrochemischen Halbzelle, der Standardwasserstoffelektrode, willkürlich auf 0 gesetzt. Diese Standardwasserstoffelektrode besteht aus frisch platinierter Platinblech in einer Säurelösung bei einer Protonenaktivität von 1. Das Platinblech wird von Wasserstoff bei einem Druck von 1 atm (101,3 kPa) umspült. An ihm findet folgende Reaktion statt:



Da das Platin, an dem die Reaktion abläuft, selbst nicht an der Reaktion beteiligt ist, handelt es sich nicht um eine Elektrode 1. Art. Vielmehr werden solche inerte Elektroden, die für ein Redoxpaar als Elektronenüberträger fungieren, als Redoxelektroden bezeichnet.

Bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode können Einzelpotentiale mittels der Nernst-Gleichung berechnet werden. Nach dieser Gleichung ist das Einzelpotential E einer Elektrode abhängig vom Standardeinzelpotential E_0 des jeweiligen Redoxpaars, der allgemeinen Gaskonstanten R , der Temperatur T , der Anzahl der übertragenen Elektronen z , der Faraday-Konstanten F sowie dem natürlichen Logarithmus des Quotienten der Aktivitäten der oxidierten und der reduzierten Form des Redoxpaars:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (1.1)$$

Im Falle von Elektroden 1. Art stellt das Metall die reduzierte Form dar. Da es sich hierbei um eine reine Phase handelt, deren Aktivität definitionsgemäß 1 ist, vereinfacht sich die Gleichung zu

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{Ox} \quad (1.2)$$

Zur Messung von Einzelpotentialen wird allerdings meist nicht die Standardwasserstoffelektrode eingesetzt, da sie schwierig zu handhaben ist. Stattdessen wird häufig eine so genannte Elektrode 2. Art als Referenzelektrode (*reference electrode*, RE) verwendet. Diese besteht wie eine Elektrode 1. Art aus einem Metallstab, der in eine Lösung seiner Metallionen eintaucht. Die Metallionen stehen hier aber zusätzlich mit einem schwer löslichen Salz im Gleichgewicht. Gebräuchliche RE sind die Silber-Silberchloridelektrode ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$) und die Kalomelektrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Cl}^-$). Im Beispiel der Silber-Silberchloridelektrode befindet sich ein Stab aus metallischem Silber, der mit Silberchlorid überzogen ist, in einer Lösung von Kaliumchlorid. Gleichung 1.2 erhält für die Silber-Silberchloridelektrode bei 25°C, der Verwendung des dekadischen statt des natürlichen Logarithmus und dem näherungsweisen Ersatz der Aktivität durch die Konzentration die Form

$$E = E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+}^0 + 0,059 \text{ V} \cdot \lg c(\text{Ag}^+) \quad (1.3)$$

Die Konzentration der Silberionen wiederum ist abhängig von der Konzentration der Chloridionen und dem Löslichkeitsprodukt (K_L) von Silberchlorid:

$$c(\text{Ag}^+) = \frac{K_L}{c(\text{Cl}^-)} \quad (1.4)$$

Nach Einsetzen von Gleichung 1.4 in Gleichung 1.3 erhält man

$$E = E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+}^0 + 0,059 \text{ V} \cdot \lg \frac{K_L}{c(\text{Cl}^-)} \quad (1.5)$$

Weiterhin können noch die Konstanten $E_{\text{Ag}/\text{Ag}^+}^0$ und K_L zu einer neuen Konstanten $E_{\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-}^0$ zusammengefasst werden:

$$E = E_{\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-}^0 - 0,059 \text{ V} \cdot \lg c(\text{Cl}^-) \quad (1.6)$$

Werden Silberionen an dieser Elektrode elektrochemisch zu elementarem Silber reduziert, gehen gemäß dem Löslichkeitsprodukt Silberionen aus Silberchlorid wieder in Lösung. Umgekehrt fallen aus der Oxidation von elementarem Silber entstandene Silberionen mit Chlorid aus. Sofern die Konzentration von Chlorid hoch genug ist, um durch den Stoffumsatz praktisch nicht verändert zu werden, bleibt auch das Potential der Silber-Silberchloridelektrode praktisch konstant und hängt lediglich von der Chloridkonzentration ab. Beispielsweise ergibt sich bei 25°C und einer Chloridkonzentration von 3 M ein Potential von +0,207 V gegenüber der Standardwasserstoffelektrode. Solche Elektroden, deren Potential sich bei Stromfluss nicht verändert, werden unpolarisierbare Elektroden genannt.

Bei polarisierbaren Elektroden dagegen wird in einem gewissen Potentialbereich ober- bzw. unterhalb des Ruhepotentials (Potential bei Stromlosigkeit) kein Strom

gemessen. Die Differenz zwischen dem Ruhepotential E_{rev} und dem Potential E_i , ab dem Strom fließt, wird als Überspannung η bezeichnet:

$$\eta = E_i - E_{\text{rev}} \quad (1.7)$$

Sie liegt begründet in der kinetischen Hemmung mindestens eines Teilschritts der elektrochemischen Umsetzung, die im Normalfall die folgenden Schritte umfasst:

1. Wanderung der elektrochemisch aktiven Substanz zur Oberfläche der Elektrode
2. Aufbrechen der Hülle aus Wassermolekülen bei solvatisierten Substanzen
3. Anlagerung der Substanz an die Elektrodenoberfläche
4. Übertragung von Elektronen von der Elektrode zur Substanz oder umgekehrt (Durchtrittsreaktion)
5. Verlassen der Elektrodenoberfläche durch die Substanz
6. Ausbildung der Solvathülle
7. Abtransport der Substanz von der Elektrode

Zusätzlich können den einzelnen Schritten chemische Reaktionen vor- oder nachgelagert sein.

1.2.2 Amperometrie

Die Amperometrie ist ein elektrochemisches Analyseverfahren, bei dem der Strom an einer polarisierbaren Arbeitselektrode (*working electrode*, WE) gemessen wird. Gebräuchliche Materialien für WE sind Platin, Gold, Silber und Kohlenstoff in verschiedener Form wie z. B. Graphitpaste oder Glaskohlenstoff. Das Potential der WE wird während der gesamten Messung gegenüber einer RE konstant gehalten. Der Stromkreis kann dabei durch die RE geschlossen werden, wodurch eine Zweielektrodenanordnung erhalten wird (linkes Schema in Abbildung 1.1). Die RE als unpolarisierbare Elektrode sollte laut der Theorie ihr Potential bei Stromfluss nicht verändern. Dieser Idealzustand ist aber besonders bei hohen Strömen mit realen RE nicht gegeben, so dass die Potentialkonstanz nicht immer gewährleistet ist. Die Dreielektrodenanordnung (rechtes Schema in Abbildung 1.1), bei der die Spannung der WE stromlos gegen die RE eingestellt wird, umgeht diesen Nachteil. Der Strom wird in dieser Anordnung über eine inerte Hilfselektrode (*auxiliary electrode*, AE) abgeleitet, die meist aus Platin besteht.

Das Ziel amperometrischer Messungen ist eine lineare Abhängigkeit des Stroms von der Konzentration des Analyten. Dies wird durch verschiedene Maßnahmen erreicht, die den Zusatz eines Leitsalzes, kontrollierte Konvektion der Lösung und die Einstellung eines geeigneten Potentials umfassen. Im Folgenden werden die Hintergründe dieser Maßnahmen erläutert.

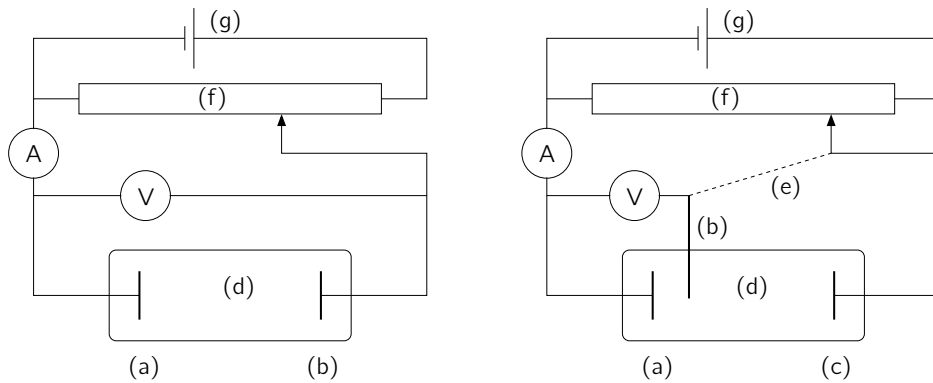


Abbildung 1.1: Amperometrische Messaufbauten nach Buchberger [Buc98]. Links: Zweielektrodenanordnung, rechts: Dreielektrodenanordnung. (A) Amperemeter, (V) Voltmeter, (a) WE, (b) RE, (c) AE, (d) Messzelle, (e) Rückkopplung, (f) Potentiometer, (g) Spannungsquelle.

Durch das Anlegen eines Potentials an die WE entsteht ein elektrisches Feld, das ionische Analyten zur Migration bewegt. Die Zugabe eines Leitsalzes in verglichen mit dem Analyten wesentlich höherer Konzentration minimiert die Migration von Analytionen, da der Stromfluss dann fast ausschließlich durch Ionen des Leitsalzes erfolgt.

Wird die Lösung gerührt, verbleibt an der Oberfläche der Elektrode dennoch eine unbewegte Schicht, die Nernst-Schicht oder Nernst'sche Diffusionsschicht genannt wird. Solch eine Schicht bildet sich auch aus, wenn in Durchflusssystemen die Konvektion der Lösung nicht durch Rühren, sondern durch einen Aufbau erreicht wird, bei dem der Flüssigkeitsstrom senkrecht auf die WE geleitet wird. Dieser Aufbau wird Wall-Jet-Zelle genannt und ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Dicke der Diffusionsschicht hängt von der Intensität des Rührens bzw. den Stromverhältnissen in der Wall-Jet-Zelle ab, ist aber bei einer gegebenen Rührgeschwindigkeit bzw. Flussrate konstant. Analyten können diese Schicht nur durch Diffusion durchqueren. Nach dem 1. Fick'schen Gesetz ist die Diffusionsstromdichte J abhängig vom Diffusionskoeffizienten D des Analyten und proportional zum Konzentrationsgradienten am Weg x :

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1.8)$$

Unter Berücksichtigung der Dicke δ der Diffusionsschicht, der Konzentration des Analyten an der Elektrodenoberfläche (c_0) und der Konzentration des Analyten in der Lösung (c_{Lsg}) gilt somit

$$J = -D \frac{c_{Lsg} - c_0}{\delta} \quad (1.9)$$

Wenn das Potential an der WE hoch genug ist, um sämtliche Analytmoleküle, die an die Oberfläche der Elektrode gelangen, sofort umzusetzen, kann die Konzentration

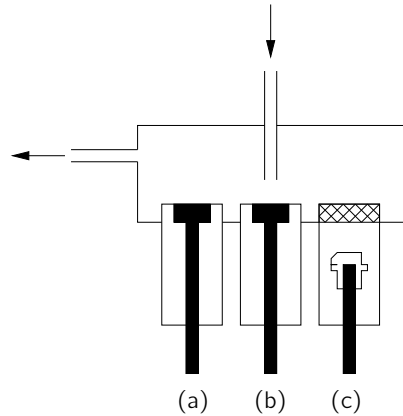


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Wall-Jet-Zelle. (a) AE, (b) WE, (c) RE am Beispiel eines mit Silberchlorid überzogenen Silberstabs, der in eine Lösung von Kaliumchlorid taucht und durch ein Diaphragma mit der durchfließenden Lösung leitend verbunden ist.

des Analyten an der Oberfläche mit 0 angegeben werden. Ist dabei der absolute Stoffumsatz so gering, dass sich dadurch die Konzentration des Analyten in der Lösung praktisch nicht ändert, ist die Diffusionsstromdichte nur von konstanten Faktoren abhängig und es gelangt zu jeder Zeit eine konstante Stoffmenge an die Elektrode:

$$J = -D \frac{c_{Lsg}}{\delta} \quad (1.10)$$

Die Stromstärke I kann aus der Diffusionsstromdichte berechnet werden, indem die Diffusionsstromdichte mit der Anzahl z der pro Reaktion übertragenen Elektronen, der Faraday-Konstanten F und der Oberfläche A der Elektrode multipliziert wird. Sämtliche Faktoren sind konstant. Somit ist auch die Stromstärke konstant und bei einem gegebenen Analyten nur von dessen Konzentration in der Lösung abhängig:

$$I = zFAJ = -zFAD \frac{c_{Lsg}}{\delta} \quad (1.11)$$

Der unter diesen Umständen gemessene Strom wird Diffusionsgrenzstrom genannt. Er wird beobachtet, wenn das an der WE angelegte Potential ausreicht, um sämtlichen an die Elektrodenoberfläche gelangenden Analyten elektrochemisch umzusetzen. Eine weitere Erhöhung des Potentials bewirkt keine Erhöhung des gemessenen Stroms, solange keine anderen elektrochemischen Reaktionen als die Umsetzung des Analyten stattfinden. Bei niedrigeren Potentialen werden dagegen in einem gewissen Potentialbereich kleinere Stromstärken gemessen, bis schließlich bei noch niedrigerem Potential überhaupt kein Strom mehr fließt. Dieser Zusammenhang des angelegten Potentials mit der Stromstärke für einen gegebenen Analyten ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Ströme, die allgemein durch die elektrochemische Umsetzung eines Stoffes zustande kommen, werden faradaysche Ströme genannt.

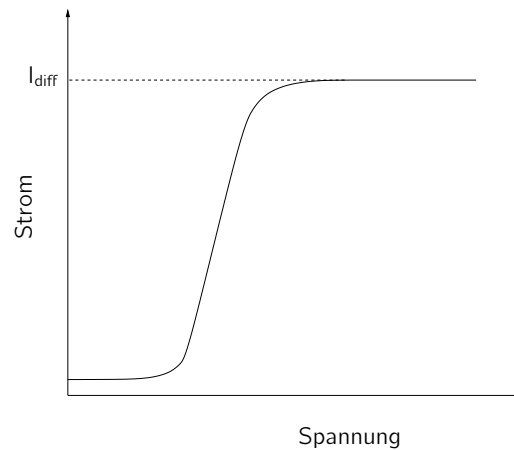


Abbildung 1.3: Abhängigkeit des Stroms von der Spannung bei amperometrischem Messaufbau (Strom-Spannungskurve). I_{diff} : Diffusionsgrenzstrom.

Je höher das zum Erreichen des Diffusionsgrenzstroms benötigte Potential für einen bestimmten Analyten ist, desto höher ist bei realen Proben die Wahrscheinlichkeit, dass auch andere Stoffe elektrochemisch umgesetzt werden und die Messung somit stören. Nach Gorton und Domínguez sind im Bereich von -110 bis 40 mV gegenüber einer Silber-Silberchloridelektrode ($c(\text{Cl}^-) = 3 \text{ M}$) die wenigsten Störungen zu erwarten [GD02]. Das benötigte Potential kann mittels cyclischer Voltammetrie (CV) ermittelt werden (Kapitel 1.2.3).

Die beschriebene lineare Abhängigkeit der gemessenen Stromstärke von der Konzentration des Analyten gilt allerdings erst ab einer gewissen Zeit nach Anlegen des Potentials, da zu Beginn der Messung der zur Konzentration proportionale, faraday-

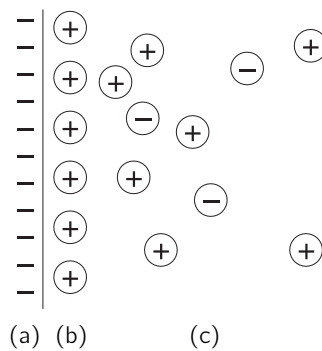


Abbildung 1.4: Elektrochemische Doppelschicht nach dem Stern-Modell am Beispiel einer negativ geladenen Elektrode. \oplus solvatisierte Kationen, \ominus solvatisierte Anionen, (a) Elektrodenoberfläche, (b) starre Stern-Schicht, (c) diffuse Schicht.

sche Strom von einem so genannten kapazitiven Strom überlagert wird. Dieser kommt durch das Ausbilden einer Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche zustande, die Kondensatoreigenschaften besitzt. Nach dem Stern-Modell besteht diese Schicht aus der Elektrodenladung entgegengesetzt geladenen, solvatisierten Ionen. Diese bilden direkt an der Elektrodenoberfläche eine starre Schicht (Stern-Schicht), gefolgt von einer in die Lösung hineinragenden diffusen Schicht (Abbildung 1.4). Die Ausbildung dieser Doppelschicht benötigt eine gewisse Zeit. Dadurch wird nach Anlegen des Potentials zunächst ein hoher kapazitiver Strom beobachtet, der exponentiell mit der Zeit abfällt. In der Praxis bedeutet dies, dass bei amperometrischen Messungen nach Anlegen des Potentials das Erreichen einer Basislinie abgewartet werden muss, um nur den faradayschen Stromanteil zu messen und einen linearen Zusammenhang mit der Konzentration des Analyten zu erhalten.

1.2.3 Cyclische Voltammetrie

Die CV ist ein vielseitig verwendbares, voltammetrisches Analyseverfahren, bei dem das Potential an einer WE mit konstanter Geschwindigkeit von einer Anfangsspannung E_1 zu einer Umkehrspannung E_2 und wieder zurück gefahren wird (Abbildung 1.5). Die Messgröße ist dabei der Strom. Wie auch bei der Amperometrie muss der zu analysierenden Lösung ein Leitsalz zugesetzt werden, um eine Migration von Analytionen zu unterdrücken. Da aber im Unterschied zur Amperometrie die Lösung nicht gerührt wird, bildet sich keine Diffusionsschicht konstanter Dicke aus. In der Folge nehmen die resultierenden Graphen eine andere Form als amperometrische Strom-Spannungs-Kurven an.

Die Vorgänge seien beispielhaft an einem Analyten dargestellt, der durch Abgabe eines einzelnen Elektrons oxidiert werden kann. Abbildung 1.6 zeigt schematisch das erhaltene cyclische Voltammogramm. Ausgehend von der Anfangsspannung E_1 steigt zunächst der Strom an, da bei einem höherem Potential nach der Nernst-Gleichung (1.1) auch ein höherer Anteil des Analyten oxidiert wird. Im Bereich des Diffusionsgrenzstroms jedoch, in dem sämtliche auf die Elektrodenoberfläche treffende Analytmoleküle elektrochemisch umgesetzt werden, ist die Stromstärke nur vom Transport

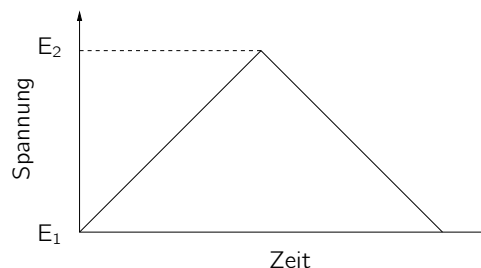


Abbildung 1.5: Spannungsverlauf bei CV von Anfangsspannung E_1 zu Umkehrspannung E_2 und zurück.

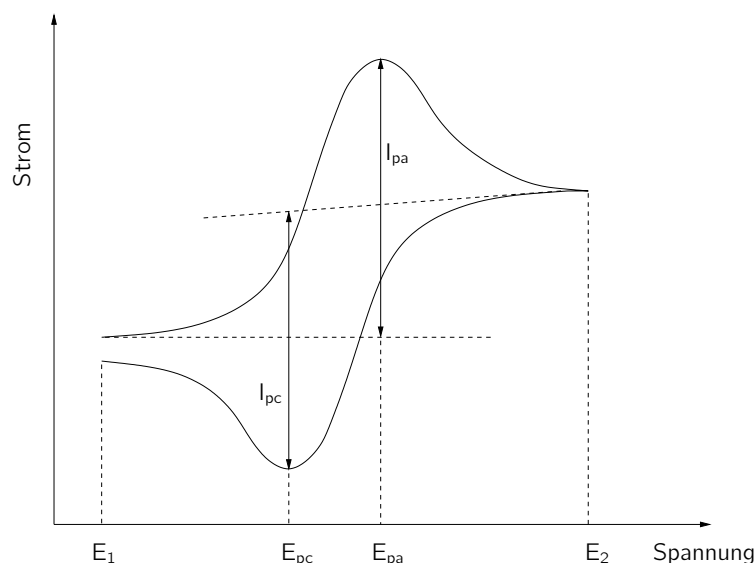


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines cyclischen Voltammogramms mit oxidierbarem Analyten.

des Analyten zur Elektrode abhängig. Dieser Transport erfolgt wie bei der Amperometrie lediglich durch Diffusion. Da aber die Lösung nicht gerührt wird, verarmt die Umgebung der Elektrode an oxidierbarem Analyt, wodurch der Strom nach Erreichen eines Peaks wieder abfällt. Der Durchlauf von einem niedrigeren zu einem höheren Potential wird anodischer Durchlauf oder anodischer Halbzyklus genannt. Das Potential bei maximalem Stromfluss trägt den Namen anodisches Peakpotential (E_{pa}), der dabei gemessene Strom den Namen anodischer Peakstrom (I_{pa}). Nach Erreichen der Umkehrspannung E_2 wird das Potential wieder vermindert. Direkt nach der Potentialumkehr liegen noch die Bedingungen des Diffusionsgrenzstroms vor, weshalb der Analyt zunächst weiterhin oxidiert wird. Der Strom sinkt, da nach wie vor die Konzentration von oxidierbarem Analyt in der Elektrodenumgebung sinkt. Da nun aber in der Umgebung der Elektrode Analytmoleküle in oxidierter Form vorhanden sind, können diese bei entsprechend niedrigeren Potentialen wieder reduziert werden. Die für den anodischen Halbzyklus beschriebenen Vorgänge finden nun mit umgekehrtem Vorzeichen statt und es wird ein kathodischer Peak (E_{pc}) erhalten, der durch einen kathodischen Peakstrom (I_{pc}) gekennzeichnet ist.

Falls die elektrochemische Umsetzung nicht kinetisch gehemmt ist, spricht man von einer reversiblen elektrochemischen Reaktion. In diesem Fall gilt, dass die Differenz des anodischen und des kathodischen Peakpotentials 58 mV geteilt durch die Anzahl z der übertragenen Elektronen entspricht:

$$\Delta E_p = \frac{58}{z} \text{ mV} \quad (1.12)$$

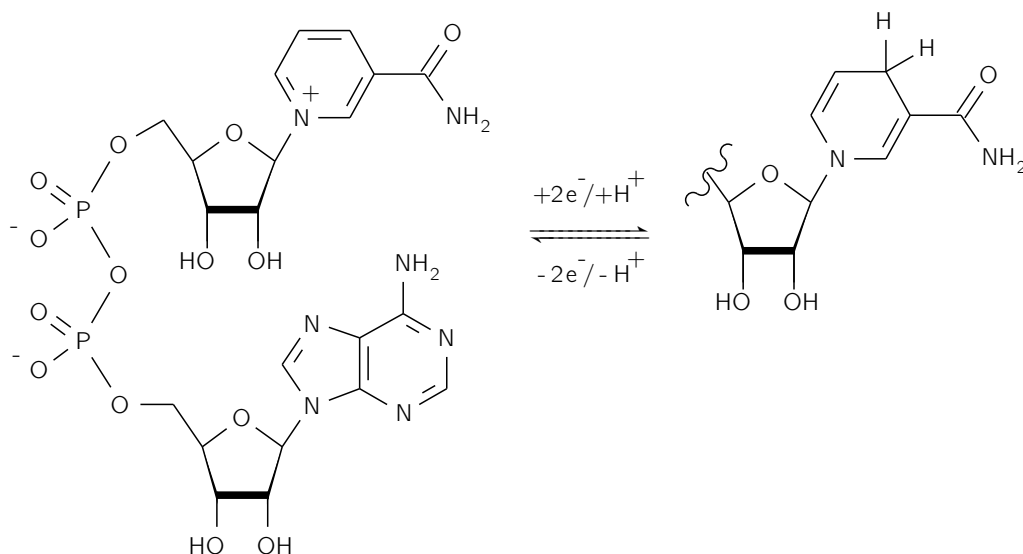
Des Weiteren sind die Beträge von I_{pa} und I_{pc} gleich. Das so genannte Halbstufenpotential, erhalten als arithmetisches Mittel des anodischen und des kathodischen Peakpotentials, entspricht dem Standardeinzelpotential des jeweiligen Redoxpaars, sofern sich die Diffusionskoeffizienten der reduzierten und der oxidierten Form nicht wesentlich unterscheiden. In der Praxis müssen die genannten Bedingungen jedoch lediglich näherungsweise erfüllt sein, damit die Reaktion als reversibel betrachtet wird.

Irreversible elektrochemische Reaktionen liegen vor, wenn die Umsetzung kinetisch gehemmt ist. In diesem Fall verbreitert sich der Abstand zwischen den Peakpotentials. Zudem ist der Peakstrom des ersten Halbzyklus höher als der Peakstrom des zweiten Halbzyklus. Somit können mittels CV Aussagen über elektrochemische Reaktionen getroffen werden. Diese sind nicht auf Untersuchungen zur Reversibilität einer elektrochemischen Reaktion beschränkt. Bei mehrstufigen Redoxreaktionen treten in cyclischen Voltammogrammen mehrere Peaks auf. Aufgrund von Veränderungen der Peakpotentiale und Peakströme bei unterschiedlichen Scanraten können komplexe Reaktionsmechanismen – auch unter Beteiligung von chemischen Reaktionen, die den elektrochemischen Schritten vor- oder nachgelagert sind – aufgeklärt werden.

Darüber hinaus kann die CV zur Ermittlung des optimalen Potentials für amperometrische Messungen dienen. Meist wird das entsprechende Peakpotential, eventuell um einen kleinen Sicherheitszuschlag erhöht, herangezogen. Es ist aber auch möglich, Gehaltsbestimmungen direkt mittels CV durchzuführen. Weiterführende Informationen zum Thema CV finden sich beispielsweise in einem Artikel von Heinze [Hei84]. Für nähere Erläuterungen zu Elektrochemie und elektrochemischen Analyseverfahren sei auf die einschlägigen Lehrbücher wie z. B. [Buc98] verwiesen.

1.2.4 Elektrochemische Quantifizierung von NADH

Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) ist ein Elektronenüberträger in Stoffwechselreaktionen. Der Übergang von der oxidierten Form (NAD^+) zur reduzierten Form (NADH) erfordert zwei Elektronen. Die Strukturen beider Formen sind in Abbildung 1.7 wiedergegeben. Mehr als 300 Redoxenzyme nutzen NAD als Cosubstrat [KMR⁺99]. Diese Enzyme werden meist Dehydrogenasen genannt und besitzen große Bedeutung für biosensorische Applikationen, da die Reaktionen elektrochemisch erfasst werden können. Dabei bietet sich an, die Menge an gebildetem NADH amperometrisch zu quantifizieren. Betrachtet man das Redoxpotential $E^{0'}$ des Redoxpaars $NADH/NAD^+, H^+$, das bei einem pH von 7 und 25°C einen Wert von -0,32 V besitzt [KSM81, BTS07], so sollte diese Bestimmung bei einem an die WE angelegten Potential von 0 V gegenüber Ag/AgCl möglich sein. Die Aktivierungsenergie dieser elektrochemischen Oxidation ist aber für viele Standardmaterialien, die als WE herangezogen werden, sehr hoch. Dadurch bedingt ist eine hohe Überspannung notwendig, um die Oxidation von NADH zu NAD^+ ablaufen zu lassen. Beispielsweise ist an Graphitelektroden eine Überspannung von 1,1 V zu beobachten [NKG95]. Bei

Abbildung 1.7: NAD⁺ und NADH.

einem entsprechend hohen Arbeitspotential werden auch viele andere Stoffe erfasst, so dass die Messung nicht selektiv ist.

Als weiteres Problem treten bei elektrochemischer Oxidation von NADH Nebenreaktionen auf. Da die Oxidation vermutlich über radikalische Zwischenstufen abläuft [Jae80], kann vor allem bei hohen Konzentrationen eine Dimerisierung stattfinden [ESSZ76]. Dimere, andere Nebenprodukte und auch NAD⁺ selbst können an die Oberfläche der WE adsorbiert werden und den Übertritt von Elektronen hemmen [ME78]. Dieser passivierende Vorgang wird *electrode fouling* genannt und tritt vor allem bei hohen NADH-Konzentrationen und langer Einwirkzeit auf. Durchflussmessungen mit nur kurzen Kontaktzeiten wirken der Passivierung entgegen [WAM92].

Um die Probleme der direkten Oxidation von NADH an Standardmaterialien wie Glaskohlenstoff, Graphit usw. zu vermeiden, sind in der Literatur verschiedene Wege zu finden. Zum einen kann eine weitere Enzymreaktion nachgeschaltet sein, um NAD⁺ zu regenerieren und eine andere Spezies zu produzieren, die dann vermessen wird. Mak et al. gehen bei verschiedenen Sensoren diesen Weg, indem sie entstandenes NADH durch Salicylathydroxylase wieder oxidieren lassen [MWSR03, MLT⁺05]. Das Enzym verbraucht dabei Sauerstoff. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration wird durch eine Sauerstoffelektrode erfasst. Eine zweite Möglichkeit ist die Entwicklung neuer Elektrodenmaterialien wie Bor-dotierte Diamantelektroden [RYM⁺99] oder mit Kohlenstoffnanoröhren beschichtete Mikroelektroden [VDG⁺07], um die benötigte Überspannung zu reduzieren. Des Weiteren sind elektrochemische Reinigungsprozeduren beschrieben, durch die die blockierenden Schichten abgelöst werden [WL88]. Zuletzt können Redoxmediatoren eingesetzt werden. Diese oxidieren NADH und werden dabei selbst reduziert:

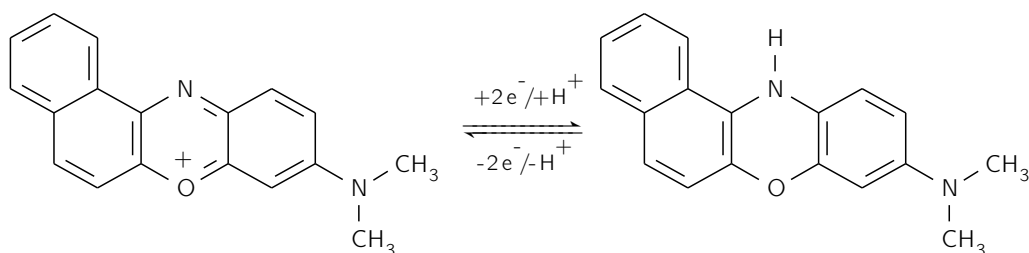
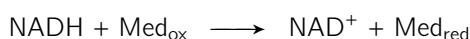


Abbildung 1.8: Meldolabau

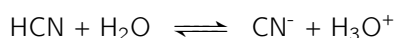


Elektrochemisch wird dann der Mediator anstelle des NADH an der WE oxidiert. Der Mediator kann sowohl in Lösung vorliegen als auch an die Elektrode adsorbiert, kovalent gebunden oder in das Elektrodenmaterial eingearbeitet sein. In den letzten drei Fällen wird von einer chemisch modifizierten Elektrode (*chemically modified electrode*, CME) gesprochen. Als Mediatoren dienen neben Hexacyanidoferrat [YHL87], Ferrocen, Benzochinon- [HS81], Phenol- und Phenazinderivaten vor allem Phenothiazin- und Phenoxazinderivate [VAB⁺03, PLG⁺93, Gor86]. Als Beispiel für einen Mediator aus der Gruppe der Phenoxazine sei Meldolabau (MB) in Abbildung 1.8 dargestellt. Eine sehr gute Übersicht über Mediatoren zur Oxidation von NADH geben Gorton und Domínguez [GD02]. Der aktuelle Stand der Forschung an elektrochemischen NADH-Sensoren wird von Radoi und Compagnone beleuchtet [RC09].

1.3 Cyanid

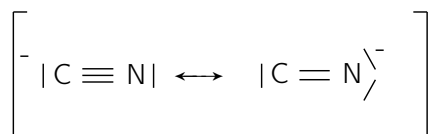
1.3.1 Eigenschaften

Cyanid ist ein einfach geladenes Anion und die korrespondierende Base des Cyanwasserstoffs (Blausäure):

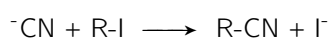


Blausäure ist eine farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 25,7°C. Sie ist mit Wasser beliebig mischbar. Bei 25°C besitzt sie einen pK_S von 9,2 ([MCM02], es finden sich auch Angaben von 9,04 bis 9,31). Dadurch liegt die Verbindung in wässrigen Lösungen mit einem pH-Wert von 7 hauptsächlich in der protonierten Form vor und kann aus diesen entweichen. Dieser Punkt wird in Kapitel 3.5.2 (Henry-Konstante) ab Seite 113 betrachtet. Blausäure ist ein hochentzündlicher, sehr giftiger und umweltgefährlicher Gefahrstoff.

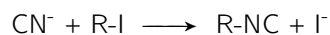
Die negative Ladung des Anions ist über das Molekül verteilt, was sich durch mesomere Grenzformeln darstellen lässt:



Bedingt durch die negative Ladung in Zusammenhang mit freien Elektronenpaaren ist Cyanid nukleophil, d. h. es kann als Elektronendonator gegenüber Kohlenstoffatomen wirken. Nach dem von Pearson [Pea63] aufgestellten Prinzip der harten und weichen Säuren und Basen (*hard and soft acids and bases*, HSAB-Prinzip) wird postuliert, dass Cyanid sowohl ein weiches Ende am Kohlenstoff als auch ein hartes am Stickstoff besitzt, also ambidente Eigenschaften aufweist [Fle90, SM01]. Bei nukleophiler Substitution unter Angriff des weichen Endes entstehen Nitrile:

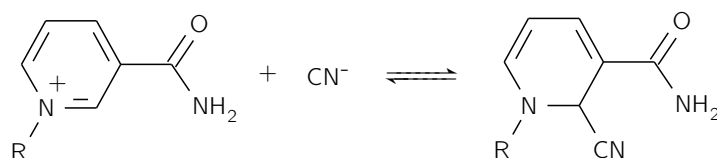


Dagegen entstehen im Falle eines Angriffs des harten Endes Isonitrile:



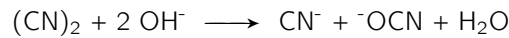
Allerdings konnten Tishkov und Mayr zeigen, dass das HSAB-Prinzip die Reaktivität von Cyanid in manchen Fällen nicht erklären kann. Allgemein lässt sich sagen, dass Cyanid vorwiegend mit dem Kohlenstoff-Ende angreift, auch wenn nach HSAB ein Angriff mit dem harten Ende erfolgen sollte [TM05].

Cyanid reagiert in seiner Eigenschaft als Nukleophil mit NAD^+ nach folgender Gleichung:



Laut Colowick, Kaplan und Ciotti ist die Reaktion reversibel und läuft bei niedrigen Cyanidkonzentrationen langsam ab. Bei einer NAD^+ -Konzentration von 0,2 mM, einer Cyanidkonzentration von 0,1 M und einem pH von 8,2 stellt sich das Reaktionsgleichgewicht nach 50 Minuten ein. Unter diesen Bedingungen wird die Hälfte des NAD^+ umgesetzt. Ein höherer pH führt zu einer schnelleren Reaktion und einem weiter auf der Seite des Produkts liegenden Gleichgewicht [CKC51].

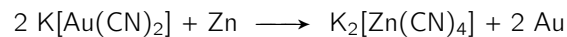
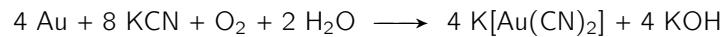
Cyanid zählt zu den Pseudohalogeniden. Dies zeigt sich an verschiedenen Eigenschaften wie der Existenz einer Pseudohalogenwasserstoffsäure, der bereits oben erwähnten Blausäure. AgCN , $\text{Hg}_2(\text{CN})_2$ und $\text{Pb}(\text{CN})_2$ sind wie die Halogenidsalze schwer löslich, die Alkalisalze dagegen löslich. Ebenso können Interpseudohalogenverbindungen wie z. B. Chlorcyan Cl-CN sowie das Pseudohalogen Dicyan $(\text{CN})_2$ synthetisiert werden. Weiterhin disproportioniert Dicyan in alkalischer Lösung zu Cyanid und Cyanat:



Eine weitere Eigenschaft von Cyanid ist die Fähigkeit, mit vielen Metallen teils sehr stabile (Pseudohalogeno-)Komplexe zu bilden. Am bekanntesten dürften die Hexacyanidoferrate mit Eisen in den Oxidationsstufen +II ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) und +III ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) sein, die als Kaliumsalze die Trivialnamen Gelbes (Kaliumhexacyanidoferrat-II) sowie Rotes Blutlaugensalz (Kaliumhexacyanidoferrat-III) tragen.

1.3.2 Verwendung

Cyanid wird in vielen Bereichen industriell angewendet. Bei der so genannten Cyanidlaugerei werden Silber und Gold aus Erzen gewonnen. Das Prinzip sei am Beispiel von Gold dargestellt. Zunächst wird Gold oxidiert und in einen Cyanidokomplex überführt. Nach Abtrennen der goldhaltigen Lösung wird das Aurat mit Zinkstaub zu elementarem Gold reduziert und setzt sich als Schlamm ab.



Silber kann analog gewonnen werden, auch aus Sulfid-Verbindungen.

Die komplexierenden Eigenschaften von Cyanid werden weiterhin galvanotechnisch genutzt, indem mittels so genannter cyanidischer Bäder Überzüge von beispielsweise Kupfer, Zink oder auch Gold erzeugt werden.

Die Verwendung als Begasungsmittel zur Schädlingsbekämpfung beruht auf der Toxizität von Blausäure, wobei jedoch die fungizide Wirkung nur sehr gering ist. Die Toxizität auf den Menschen wurde vielfach für Mord und Selbstmord ausgenutzt. Als Kampfstoff (Giftgas) eignet sich Blausäure aufgrund der Flüchtigkeit nur wenig. Traurige Berühmtheit erlangte Zyklon B, ein blausäurehaltiges Insektizid, als Instrument zum Völkermord in den Gaskammern des Holocausts während des nationalsozialistischen Regimes in Deutschland.

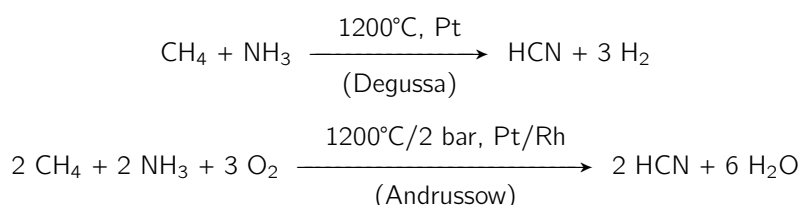
In Südostasien ist trotz gesetzlicher Verbote Cyanidfischerei üblich. Dabei werden vor allem in Salzwässern große Cyanidmengen eingebracht, um Fische zu betäuben und einzusammeln. Diese werden dann hauptsächlich als Zierfische, aber auch als Speisefische verkauft. Es wird geschätzt, dass allein in den Korallenriffen der Philippinen seit dem Jahr 1960 mehr als 1000 Tonnen Cyanid zu Fischfangzwecken eingesetzt wurden. Dadurch entstanden und entstehen große Schäden an marinen Ökosystemen [MYR05a].

In der organischen Chemie wird Blausäure zur Synthese von Methylmethacrylat, Methacrylnitril, Acrylnitril, Adiponitril, Methionin, Cyanurchlorid und Oxamid sowie

allgemein zur C-Kettenverlängerung in großer Menge benötigt [WA98]. Die vier erstgenannten Stoffe dienen hauptsächlich der Kunststoffherzeugung. Im Falle des Acrylnitrils ist Blausäure je nach Syntheseweg entweder Edukt oder fällt als Nebenprodukt an. Methionin wird als Nahrungsergänzungsmittel in der Tiernahrung sowie zur therapeutischen Harnansäuerung verwendet, die der Wirkoptimierung von Antibiotika wie Ampicillin dient. Aus Cyanurchlorid, hergestellt über die Zwischenstufe des Chlorcyans, werden 1,3,5-Triazin-Herbizide und optische Aufheller synthetisiert. Oxamid dient als Stickstofflieferant für Pflanzen. Da es in Wasser schwer löslich ist, kann es als Depot-Dünger eingesetzt werden.

1.3.3 Herstellung

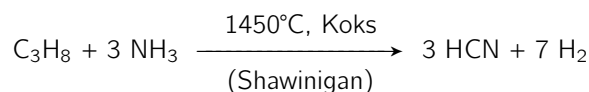
Für den Laborbedarf wird Cyanid z. B. als Natrium- oder Kaliumsalz bezogen. Blausäure wird im Labormaßstab durch Ansäuern einer dieser Chemikalien erzeugt. Die industrielle Herstellung erfolgt meist aus Ammoniak und Methan über das Degussa- oder das Andrussow-Verfahren [Wib07]:



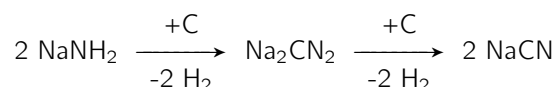
Seltener ist die Gewinnung von Blausäure durch Dehydratisierung von Formamid bei 380–430°C unter vermindertem Druck und Einsatz von Eisen- oder Aluminiumphosphat mit Zusätzen von z. B. Magnesium oder Calcium [WA98]:



Das energieintensive Shawinigan-Verfahren, bei dem Kohlenwasserstoffe wie z. B. Propan mit Ammoniak bei 1300–1600°C in einem Wirbelbett aus feinem Koks zu Blausäure und Wasserstoff umgesetzt werden, wird kaum noch eingesetzt [WA98]:



Eine ebenfalls veraltete Möglichkeit, Natriumcyanid herzustellen, ist das Castner-Kellner-Verfahren. Dabei entsteht aus Ammoniak und geschmolzenem Natrium Natriumamid (NaNH_2). Dieses wird zusammen mit Kohle geglüht, wobei über Natriumcyanamid als Zwischenstufe schließlich Natriumcyanid entsteht [Wib07]:



1.3.4 Cyanogene Glykoside

In der Natur kommt Cyanid hauptsächlich gebunden in cyanogenen Glykosiden (CG) vor. Als solche werden chemische Verbindungen bezeichnet, die aus einem glykosylierten α -Hydroxynitril bestehen. Bislang wurden mehr als 75 verschiedene Strukturen in über 3000 Pflanzenarten beschrieben [Vet00, MWS95, Pou90]. Zwei Strukturbeispiele sind in Abbildung 1.9 aufgeführt. Es handelt sich dabei zum einen um Prunasin, das in Arten von *Prunus* wie z. B. *Prunus laurocerasus* L. (Lorbeerkirsche oder auch Kirschlorbeer) gefunden wurde. Ein Austausch des Zuckerbausteins Glucose (Glc) gegen Gentiobiose führt zu Amygdalin, dem vorherrschenden CG in Bitteren Mandeln (*Amygdalae amarae* tot.), den Früchten von *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb var. *amara* (DC.) Buchheim (Mandelbaum). Zum anderen ist in Abbildung 1.9 Linamarin dargestellt. Dieses CG ist ein Bestandteil von beispielsweise *Manihot esculenta* Crantz (Maniok). Die Gattung *Prunus* gehört zur Familie der Rosaceae, während *Manihot* zu den Euphorbiaceae gezählt wird. Weitere Pflanzenfamilien mit Gattungen, die CG enthalten, sind beispielsweise Adoxaceae (*Sambucus*), Linaceae (*Linum*) und Fabaceae (*Phaseolus*).

Pflanzen, die CG enthalten, besitzen Enzyme, die mittels der in Abbildung 1.10 beispielhaft für Linamarin gezeigten Reaktionen aus den Glykosiden Blausäure freisetzen können. β -Glucosidase (Linamarase, EC 3.2.1.21) spaltet den Zuckerbestandteil ab, während Hydroxynitrilase (EC 4.1.2.37) das entstandene α -Hydroxynitril (synonym Cyanohydrin) in ein Keton und Blausäure umsetzt. Der letzte Schritt erfolgt auch spontan. Diese Enzyme sind in anderen Kompartimenten als die CG gespeichert, so dass die Glykoside unter normalen Bedingungen intakt bleiben. Werden die Zellen zerstört, indem z. B. Tiere diese als Nahrung nutzen, kommen Enzyme und CG in Kontakt und Blausäure wird freigesetzt. Seit einiger Zeit ist die These, dass CG als Schutz vor Fraßfeinden produziert werden, allgemein akzeptiert [MWS95].

1.3.5 Enzyme mit Cyanid als Substrat

Cyanid ist einerseits stark toxisch (siehe Kapitel 1.3.6), kann aber andererseits auch als Stickstoffquelle dienen. Beides führte im Laufe der Evolution zu einer Vielfalt an Stoffwechselwegen, die Cyanid entgiften und teilweise sogar als Stickstoffquelle

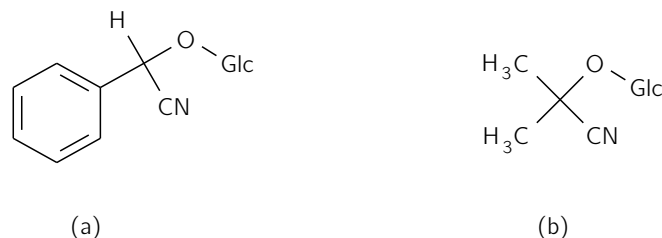


Abbildung 1.9: Strukturbeispiele von CG. (a) Prunasin, (b) Linamarin.

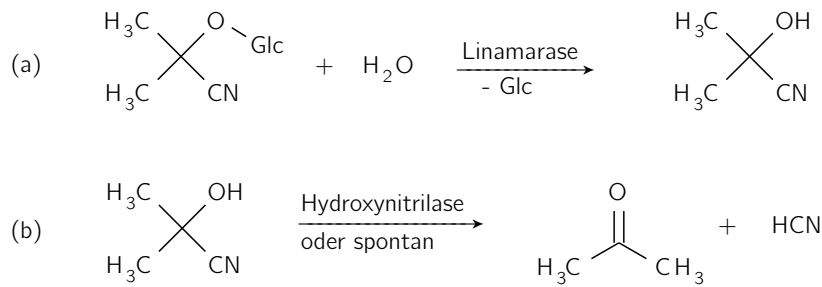
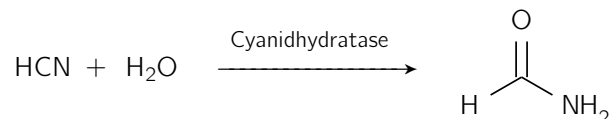


Abbildung 1.10: Freisetzung von HCN aus CG am Beispiel von Linamarin. (a) Deglycosylierung von Linamarin zu Acetoncyanohydrin, (b) Freisetzung von HCN aus Acetoncyanohydrin durch Spaltung zu Aceton und HCN.

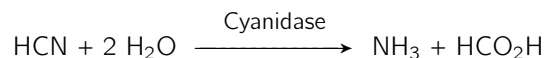
zugänglich machen. Enzyme mit Cyanid als Substrat finden sich bei den Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Lyasen (EC-Nummern 1 bis 4).

Obwohl meist zu den hydrolytischen Abbauwegen gezählt, ist Cyanidhydratase (auch Formamid-Hydrolyase, EC 4.2.1.66) formal den Lyasen zugeteilt. Durch Anlagerung eines Wassermoleküls entsteht aus Blausäure Formamid:



Cyanidhydratase-Aktivität wurde in etlichen Pilzen wie z. B. *Fusarium solani* nachgewiesen. Die für die enzymatische Aktivität verantwortlichen Proteine der verschiedenen Pilzarten weisen starke Ähnlichkeiten bezüglich der Aminosäuresequenz auf, d. h. die genetischen Strukturen sind möglicherweise hochgradig konserviert [BDT⁺02].

Einen Schritt weiter als das obige Reaktionsschema geht die von Cyaniddihydratase (Cyanidase, EC 3.5.5.1) katalysierte Reaktion. Da dieses Enzym in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, wird es hier ausführlicher als andere Enzyme beleuchtet. Blausäure wird durch Cyanidase zu Ammoniak und Ameisensäure hydrolysiert:



Proteine mit dieser Enzymaktivität wurden bislang ausschließlich bei Bakterien, nämlich *Alcaligenes xylosoxidans* ssp. *denitrificans* [IHPG91], *Bacillus pumilus* [MRWL93], *Pseudomonas stutzeri* [WYIK98a, WYIK98b] bzw. *P. fluorescens* [FK05] und *Klebsiella* sp. [MLT⁺05] gefunden. Zur Zeit sind lediglich die Aminosäuresequenzen der Proteine aus *B. pumilus* und *P. stutzeri* bestimmt. Arbeiten von Jandhyala et al. [JBM⁺03] zeigen für diese beiden Proteine eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 80 %, wobei die Basenabfolge der DNA aber nur zu 43 % deckungsgleich ist. Cyanidase aus *P. stutzeri* ist auf DNA-Ebene somit einigen Cyanidhydratasen, mit denen bis zu 70 % Übereinstimmung besteht, ähnlicher [OT03]. Für diese beiden

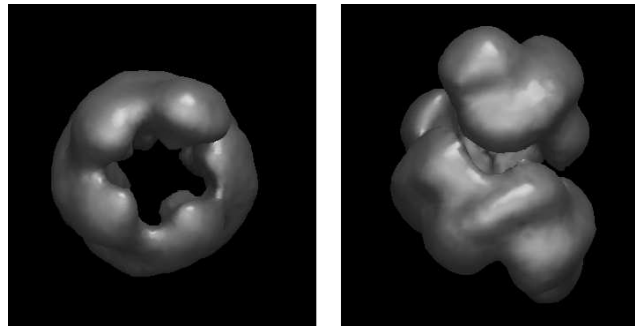
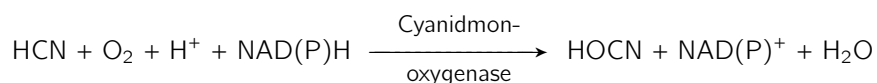
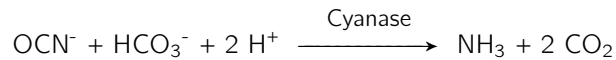


Abbildung 1.11: Struktur der Cyanidase aus *P. stutzeri* nach Sewell et al. [SBM⁺03], erhalten durch Kryoelektronenmikroskopie mit einer Auflösung von 25 Å. Quelle: The Electron Microscopy Data Bank, [TNC⁺02].

Cyanidase-Proteine sind zudem Strukturvorschläge vorhanden, die auf kryoelektronenmikroskopischen Experimenten beruhen. Demnach handelt es sich um Spiralen, die im Falle des Enzyms aus *P. stutzeri* aus 14 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 38 kDa pro Untereinheit (Abbildung 1.11) und im Falle des Proteins aus *B. pumilus* aus 18 Untereinheiten von je 37 kDa bestehen. Mittels Elektronenmikroskopie kann nicht auf atomarer Ebene aufgelöst werden. Sewell et al. erarbeiteten jedoch Strukturvorschläge auf der Basis von Homologiemodellen zu bereits bekannten Nitrilasen [SBM⁺03, JBM⁺03]. Die Strukturvorschläge für Cyanidasen sind allerdings nicht in der Proteindatenbank (PDB) des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, [BWF⁺00], hinterlegt. Arbeiten von Watanabe et al. zeigen, dass analog zu Nitrilasen ein Cysteinrest für die Enzymaktivität der Cyanidase aus *P. stutzeri* notwendig ist, was die Anwesenheit von Cystein im aktiven Zentrum nahe legt [WYIK98c]. Weitere am aktiven Zentrum beteiligte Aminosäuren sind höchstwahrscheinlich Lysin und Glutaminsäure [JBM⁺03]. Für vier der fünf Proteine sind kinetische Daten veröffentlicht, die in Tabelle 1.1 zusammengetragen sind. Nicht in der Tabelle erfasst ist die Halbwertszeit der Enzymaktivität. Diese ist in der Literatur nur für eine Cyanidase-Präparation der Firma Novo Nordisk aus *Alcaligenes xylosoxidans* angegeben und betrug 11 Tage [BKPB92]. Für Cyanidase aus *B. pumilus* und *A. xylosoxidans* ist bekannt, dass Formamid weder als Substrat akzeptiert noch aus Cyanid gebildet wird [IHPG91, MRWL93].

In Reviews werden regelmäßig oxidative Abbauewege im Detail beschrieben. So zeigt Ebbs einen Weg über eine Cyanidmonooxygenase, wobei das entstandene Cyanat in einer nachgeschalteten Reaktion mittels des gut untersuchten Enzyms Cyanase (EC 4.2.1.104) zu Kohlendioxid und Ammoniak umgesetzt werden kann [Ebb04]:





Daneben beschreibt Ebbs einen weiteren Weg über eine Cyaniddioxygenase, wobei Cyanid direkt zu Ammoniak und Kohlendioxid umgesetzt werden soll. Jedoch sind weder die vermuteten Enzyme (Cyanidmonooxygenase, Cyaniddioxygenase) als Proteine isoliert, noch ist der genaue Reaktionsablauf bewiesen. Es liegen scheinbar eindeutige Ergebnisse vor, die zeigen, dass bei einem *Pseudomonas fluorescens*-Stamm unter anaeroben Bedingungen kein Cyanidabbau stattfindet [HK83, KFP01]. Des Weiteren entspricht der Verbrauch von NADH im Überstand eines zellfreien Extrakts dieses Stammes dem von KCN; ohne NADH findet kein Cyanidabbau statt. Neuere Untersuchungen von Fernandez und Kunz [FK05] geben jedoch Rätsel auf. Sie wiesen im Extrakt dieses Stammes Cyanidase-Aktivität nach, die weder Sauerstoff noch NADH zur Umsetzung von Cyanid zu Ammoniak und Formiat benötigt, sondern wie oben dargestellt hydrolytisch arbeitet. Somit sollte der Abbau von Cyanid auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen.

Weiter kompliziert wird der Sachverhalt, wenn bedacht wird, dass das durch Cyanidase entstandene Formiat durch Formiatdehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) mit NAD⁺ als Cosubstrat zu Kohlendioxid oxidiert werden kann:

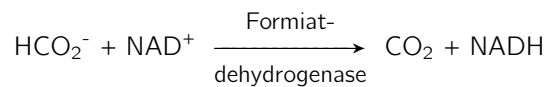
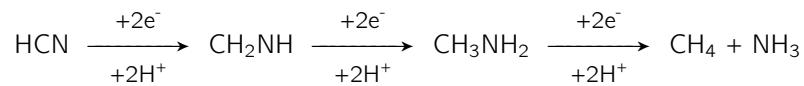


Tabelle 1.1: Umsatzraten von Proteinen mit Cyanidase-Aktivität. Die Aktivität ist entweder als enzymkinetische Kennzahl (v_{\max}) oder als reale Aktivität unter den unter „Methode“ genannten Bedingungen angegeben.

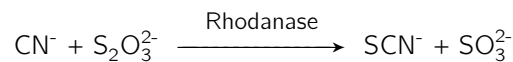
Protein	Aktivität ($\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)	Methode	Referenz
aufgereinigt, nativ aus <i>A. xylosoxidans</i>	1333	unbek.	KCN 50 mM, 25°C, pH 7,8	[IHPG91]
aufgereinigt, nativ aus <i>B. pumilus</i>	1466	2,56	v_{\max} , 37°C, pH 8	[MRWL93]
rekomb. in <i>E. coli</i> aus <i>B. pumilus</i>	1617	7,3	v_{\max} , 23°C, pH 7,6	[JWSB05]
aufgereinigt, nativ aus <i>P. stutzeri</i>	910	1,7	KCN 10 mM, 30°C, pH 7,5	[WYIK98b]
rekomb. in <i>E. coli</i> aus <i>P. stutzeri</i>	983	2,8	KCN 10 mM, 30°C, pH 7,5	[WYIK98a]
rekomb. in <i>E. coli</i> aus <i>P. stutzeri</i>	1667	5,9	v_{\max} , 23°C, pH 7,6	[JWSB05]
aufgereinigt, nativ aus <i>P. fluorescens</i>	1667	8,3	KCN 20 mM, Rest unbek.	[FK05]

Damit werden mit der Kombination Cyanidase/FDH die gleichen Endprodukte wie mit Cyanidmonooxygenase/Cyanase bzw. Cyaniddioxygenase erhalten. Die Anwesenheit einer FDH wird von Fernandez und Kunz sogar als gegeben betrachtet. Dennoch sprechen sie sich gegen die Vermutung aus, dass Cyanidase für den bei *P. fluorescens* beobachteten Cyanidabbau verantwortlich ist. Hier müssen weitere Untersuchungen Klarheit schaffen.

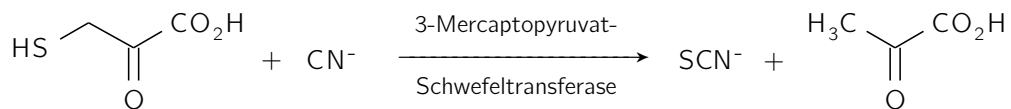
Besser ist die Kenntnislage beim umgekehrten Abbauweg, der Reduktion von Cyanid. Das Enzym Nitrogenase (EC 1.18.6.1), das bei stickstofffixierenden Organismen wie z. B. *Azotobacter vinelandii* molekularen Stickstoff (N_2) zu Ammoniak reduziert, kann neben N_2 , Azid und anderen Substraten auch Blausäure über verschiedene Zwischenstufen bis zu Methan und Ammoniak abbauen, wobei teilweise auch die Zwischenstufen freigesetzt werden [KJLL⁺03, FDN06]:



Thiosulfat- sowie Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase zählen zu den Transferasen. Diese übertragen Schwefel aus verschiedenen Substraten auf Cyanid, wodurch das weniger giftige Thiocyanat entsteht. Im menschlichen Körper wird Cyanid mit Hilfe dieser beiden Enzyme entgiftet. Dies wird im Detail in den Kapiteln 1.3.6 und 1.3.7 besprochen. Im Falle von Thiosulfat-Schwefeltransferase (Rhodanase, EC 2.8.1.1) wird, wie der Name schon sagt, Thiosulfat als Substrat benutzt:



Weitere Informationen über Rhodanase sind beispielsweise in einer Arbeit von Cipollone et al. zu finden [CAT⁺08]. 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase (EC 2.8.1.2) benutzt dagegen 3-Mercaptopyruvat (3-Mercaptobrenztraubensäure):



Zuletzt soll kurz erwähnt werden, dass auch weitere Transferasen und Lyasen Cyanid als Substrat akzeptieren. Dies sind Cystein-Synthase (β -Cyano-L-Alanin-Synthase, EC 2.5.1.47), O-Acetylhomoserin-Aminocarboxypropyltransferase (γ -Cyano- α -Aminobuttersäure-Synthase, EC 2.5.1.49) und L-3-Cyanoalanin-Synthase (EC 4.4.1.9). Nähere Informationen zu diesen Enzymen finden sich unter anderem in den Arbeiten von Omura et al. [OIK⁺03] sowie in der Enzymdatenbank BRENDA [CSG⁺09].

Die Kenntnis dieser Enzyme ist relevant für drei Anwendungsbereiche. Zum einen gibt es vielfältige Anstrengungen, die Entsorgung von Cyanid mittels chemischer Methoden (siehe Kapitel 2.16.2 sowie [YJ95]) auf enzymatische bzw. mikrobielle Methoden umzustellen. Viele Reviews, die sich mit biochemischen Cyanid-Abbauwegen beschäftigen, tun dies mit dem Hintergrund der Abfallentgiftung [BC06, Ebb04, AM03,

DH95, Ray92]. In der Praxis hat sich dies bislang aber noch nicht durchgesetzt. Cyanidabfälle werden in den allermeisten Fällen chemisch umgesetzt. Die Produktion eines vormals kommerziell erhältlichen Präparats zur mikrobiellen Entgiftung von Cyanid, CYANIDASE[®] von Novo Nordisk [BKPB93, BKPB92], ist seit vielen Jahren eingestellt.

Des Weiteren hilft das Wissen um die körpereigene Entgiftung von Cyanid, Antidote und Strategien bei Cyanidintoxikationen zu entwickeln. Dieser Aspekt wird im Detail in Kapitel 1.3.7 besprochen.

Der für die vorliegende Arbeit wichtigste Anwendungsbereich, in dem Enzyme mit Cyanid als Substrat zum Einsatz kommen, ist die Entwicklung von Enzym- bzw. Biosensoren zur Detektion von Cyanid. Bereits bekannte Verfahren sind in Kapitel 1.3.10 aufgeführt.

1.3.6 Toxizität

Cyanid ist eine hochgiftige Verbindung. Die tödliche Dosis beträgt zwischen 50 und 100 mg Blausäure bzw. 150–250 mg KCN/NaCN [RK08]. Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) schlägt für Trinkwasser bezogen auf Cyanid einen Grenzwert von $0,07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2,7 \text{ } \mu\text{M}$) vor [WHO08]. In der Raumluft sind HCN-Konzentrationen von 100 ppm innerhalb einer Stunde, Konzentrationen von 300 ppm innerhalb von Minuten tödlich¹ [BG98]. Die MAK-Kommission empfiehlt eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von 1,9 ppm. Andere Länder setzen großzügigere Grenzwerte. So liegen der österreichische MAK-Wert und der Grenzwert der Occupational Safety and Health Administration (OSHA, USA) bei 10 ppm. Die Geruchsschwelle (Geruch nach Bitteren Mandeln) liegt bei 0,2–5,1 ppm [ges]; allerdings kann ein großer Teil der Menschheit diesen Geruch genetisch bedingt nicht wahrnehmen [KS53]. Die Aufnahme in den Körper kann durch Einatmen von Blausäure, Ingestion von löslichen Cyanidsalzen und auch über Hautpenetration erfolgen.

Die akute Toxizität beruht auf der Inhibierung von Stoffwechselsystemen, an denen Enzyme mit Metallionen beteiligt sind, die durch Cyanid komplexiert werden (Fe, Cu, Mo, Zn). Zudem werden Carbonylkomponenten unter Bildung von α -Hydroxynitrilen und Schwefelverbindungen unter Bildung von Thiocyanat angegriffen. Hauptangriffspunkt ist das Eisenion der Oxidationsstufe +III der prosthetischen Gruppe Häm a_3 im Enzym Cytochrom-c-Oxidase [Cum04, BG98, Way84]. Da Cytochrom-c-Oxidase das terminale Enzym der Atmungskette in den Mitochondrien darstellt, ist die gesamte Atmungskette einschließlich des Citratzyklus und in der Folge der aerobe Abbau von Glucose blockiert („innere Erstickung“). Der anaerobe Abbau von Glucose kann den Energiebedarf des Körpers alleine nicht decken, wovon zunächst das zentrale Nervensystem, später auch andere Organe und das kardiovaskuläre System betroffen sind.

Eine Vergiftung zeigt sich in Hyperpnoe und unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Schwindel und Übelkeit. Hohe Dosen führen zu Koma, Krämpfen und

¹ 1 ppm HCN entspricht etwa $1,1 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ bei 25°C

schließlich Atem- und Herzstillstand. Die Haut färbt sich rot, da auch das venöse Blut mit Sauerstoff gesättigt ist. Die Zyanose, eine Blaufärbung der Haut, würde das Gegenteil anzeigen, nämlich eine Sauerstoffuntersättigung des arteriellen Blutes. Sie kann allerdings nach Gabe von Methämoglobinbildnern (siehe Kapitel 1.3.7) auftreten.

Die körpereigene Entgiftungsrate beträgt ca. $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{KG}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [AFHS05]. Maßgeblich daran beteiligt sind Rhodanase und 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase (siehe Kapitel 1.3.5), die Cyanid zu Thiocyanat umsetzen. Die Entgiftungsrate ist begrenzt durch den von diesen Enzymen nutzbaren Schwefelvorrat im Körper.

Chronische Intoxikation mit subletalen Dosen, etwa durch den regelmäßigen Genuss unzureichend zubereiteter cyanogener Nahrungsmittel wie Maniok, führt zu irreversiblen zentralen und peripheren Nervenschädigungen. Des Weiteren kann es zu Erkrankungen der Schilddrüse kommen, da das bei der Entgiftung entstandene Thiocyanat, ein Pseudohalogenid, Iod ähnlich ist.

1.3.7 Therapie von Vergiftungen

Die Therapie von akuten Cyanidvergiftungen beruht auf drei Mechanismen. Diese umfassen die Komplexierung des Cyanids durch Cobaltionen, medikamentös induzierter Methämoglobinämie sowie die Unterstützung der körpereigenen Enzyme, die Cyanid zu Thiocyanat entgiften. Welches die optimale Strategie ist, ist umstritten [Cum04]. Im Folgenden wird der sich grob abzeichnende Konsens dargestellt.

Der Einsatz von freien oder mittels EDTA komplexierten Cobaltionen wird nicht mehr empfohlen, da schwere Nebenwirkungen auftreten können. Stattdessen wird das unproblematische, aber teure Hydroxocobalamin (Vitamin B_{12a}) angewendet, das unter Ligandenaustausch pro Mol ein Mol Cyanid bindet und dabei zu Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) umgewandelt wird. Hydroxocobalamin wird inzwischen in Deutschland als Mittel der ersten Wahl angesehen [AFHS05, HDB07]. Einige Autoren raten jedoch angesichts fehlender Erfahrung zur Vorsicht und empfehlen, alternative Antidote wie Thiosulfat weiterhin vorzuhalten [Erd07, KBT07].

Gaben von Natriumthiosulfat erhöhen den Umsatz von Cyanid zu Thiocyanat durch das körpereigene Enzym Rhodanase. Da sich Rhodanase vor allem in den Mitochondrien der Leber und der Nieren befindet, ist das Enzym zum einen für Thiosulfat schwer zugänglich und zum anderen weit entfernt von durch Cyanid gefährdeten Organen wie Herz und Nervensystem [NGC⁺07]. Dennoch zeigen Thiosulfat-Gaben gute Wirksamkeit bei Cyanid-Vergiftungen und zählen neben Hydroxocobalamin zur Standardtherapie [AFHS05, RK08, KBT07].

3-Mercaptopyruvat, das Cosubstrat der 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase, wurde bisher nicht als Antidot eingesetzt, da es zu instabil ist. Nagasawa et al. entwickelten jedoch kürzlich Prodrugs dieser Substanz, die auch peroral wirksam sind [NGC⁺07]. Im Tiermodell konnte eine präventive Wirkung bewiesen werden, so dass diese Prodrugs gefährdeten Personen wie z. B. Feuerwehrleuten prophylaktisch verabreicht werden könnten. Da 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase ubiquitär im Cyto-

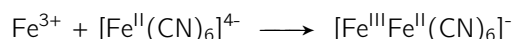
plasma vorhanden ist, könnten sich diese Prodrugs der Thiosulfat-Gabe als überlegen erweisen.

Zuletzt können noch Methämoglobinbildner wie p-N,N-Dimethylaminophenol (in Deutschland bevorzugt), Natriumnitrit (in den USA favorisiert) oder Amylnitrit (3-Methyl-1-nitrosooxybutan bzw. Isopentylnitrit) eingesetzt werden. Ziel dieser Medikation ist es, ca. 30 % des Häm-Eisens, das physiologisch in der Oxidationsstufe +II vorliegt, in dreiwertiges Eisen umzuwandeln. Cyanid wird dann aufgrund der höheren Affinität an Fe^{3+} gebunden. Diese Behandlung wird inzwischen meist nur dann klinisch angewendet, wenn weder Hydroxocobalamin noch Thiosulfat verfügbar sind. Zudem sind Methämoglobinbildner wegen der Herabsetzung der Sauerstoffkapazität des Blutes sowie ihrer blutdrucksenkenden Wirkung bei Rauchvergiftungen mit Cyanidbeteiligung kontraindiziert.

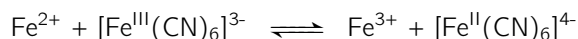
Eine gewisse Berechtigung hat jedoch Amylnitrit. Dieses kann in Ampullenform an gefährdeten Orten in der galvanischen und der chemischen Industrie platziert und im Notfall von Ersthelfern noch vor Eintreffen eines Notarztes appliziert werden. Dazu wird ein Tuch mit der Flüssigkeit befeuchtet und an die Atemwege des Patienten gebracht, so dass von diesem Amylnitritdämpfe eingeatmet werden. Der Geschwindigkeitsvorteil dieser Behandlung wiegt die Nachteile der Methämoglobinbildner gegenüber Hydroxocobalamin und Thiosulfat bei weitem auf. Dies zeigt sich in der Beschreibung eines Arbeitsunfalls, bei dem der Patient das komplette Eintauchen in eine Cyanid-Lösung über Minuten höchstwahrscheinlich aufgrund der Anwendung von Amylnitrit durch einen Ersthelfer überlebte [Pic85, DM85].

1.3.8 Nachweis- und Bestimmungsverfahren ohne biologische Komponente

Nasschemisch kann Cyanid durch etliche Fällungsreaktionen nachgewiesen werden. Mit Cu^{2+} fällt gelbes $\text{Cu}(\text{CN})_2$ aus, das sich in weißes CuCN und Dicyan zersetzt. AgNO_3 führt zu einem Niederschlag von weißem AgCN , sofern Ag^+ im Überschuss vorliegt; ansonsten erfolgt die Bildung von löslichem Dicyanidoargentat $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. AgCN kann weiterhin durch Ammoniak und Thiosulfat, aber nicht durch Säuren gelöst werden. Das durch einen Überschuss Fe^{2+} entstandene Hexacyanidoferrat-II reagiert mit Fe^{3+} zu einem blauen Farbstoff, dem Berliner Blau (auch Preußisch Blau, PB):



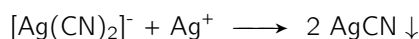
Im umgekehrten Fall, der Reaktion von Fe^{2+} mit Hexacyanidoferrat-III, entsteht das gleiche Produkt, da folgendes Gleichgewicht vorliegt:



Es liegt fast vollständig auf der rechten Seite, da $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ im Gegensatz zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^{3-}$ Edelgaskonfiguration aufweist [Wib07]. Mit K^+ entsteht lösliches, mit

einem Überschuss an Fe^{3+} unlösliches Berliner Blau, $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})]_3$. Von dieser Reaktion zu einem blauen Farbstoff stammt sowohl der Begriff „Blausäure“ als auch „Cyanid“, abgeleitet vom altgriechischen κυάνεος (kyaneos, Deutsch: schwarzblau). Sulfidionen reagieren mit Cyanid zu Thiocyanat, das mit Fe^{3+} eine tiefrote Verbindung ergibt. Die Spezifität sämtlicher Fällungs- und Farbreaktionen kann wesentlich erhöht werden, wenn die Reaktion in einem Gärröhrchen durchgeführt wird, in das Cyanid durch Ansäuren übergetrieben wird. Der im Lehrbuch „Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum“ auch in der neuesten Auflage aus dem Jahre 2005 [JB05] an erster Stelle genannte organoleptische Nachweis über den Geruch nach Bitteren Mandeln nach Ansäuern muss sowohl als unsicher bezogen auf das Ergebnis als auch als äußerst gefährlich betrachtet werden, da Cyanid bzw. Blausäure einerseits stark toxisch ist und andererseits der Geruch von einem Großteil der Bevölkerung nicht wahrgenommen wird.

Die quantitative Bestimmung von Cyanid kann mittels verschiedenster Verfahren vorgenommen werden. Eines der ältesten Verfahren ist die Methode nach Liebig, bei dem die Probe mit Silbernitrat-Maßlösung titriert wird. Zunächst entsteht der lösliche Dicyanidoargentat-Komplex. Der Endpunkt wird an einer Trübung erkannt, da AgCN ausfällt, sobald das Verhältnis von Cyanidionen zu Silberionen kleiner als 2 ist:



Das Deutsche Institut für Normung (DIN) nimmt in der Vorschrift DIN 38405-13 alternativ ein mit Iodid oder einem Farbindikator (p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin) modifiziertes Titrationsverfahren nach Liebig oder eine photometrische Vermessung von Cyanid nach Umsetzung zu einem Farbstoff mit Hilfe der König-Reaktion vor [din81]. Um Störungen zu vermeiden, wird das Cyanid zuvor angesäuert und in eine alkalische Lösung übergetrieben. Der genaue Ablauf der Aufreinigung sowie die Theorie der König-Reaktion zur photometrischen Vermessung finden sich in Kapitel 2.12. Es existieren weitere Normen des DIN, bei denen Cyanid in kontinuierlicher Fließanalyse nach Inline-Destillation oder Diffusion durch eine Membran ebenfalls mittels Farbstoffbildung nach der König-Reaktion bestimmt wird [din06, eni02].

Jin et al. entwickelten eine fluorimetrische Methode, bei welcher der Cyanidgehalt über Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots gemessen wird [JCFPSM04]. Christian und Ruzicka bestimmten Cyanid über Lösen von Kupfer aus einer mit Kupfersulfid bestückten Säule und Vermessung des Kupfers mittels Atomabsorptionsspektroskopie [CR86].

Die Bestimmung über Quarzmikrowaagen gelang einigen Forschern über Komplexierung von auf Quarzmikrowaagen immobilisiertem Nickel [MA02] sowie Amalgambildung einer Goldschicht durch elementares Quecksilber, das sich unter Einfluss von Cyanid durch Disproportionierung aus Quecksilber-I-iodid bildet [GSDO98].

Ebenfalls beschrieben sind chromatographische Methoden unter Verwendung von Gaschromatographie [VAS74, KNK96], Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie [GS88] und Ionenaustauschchromatographie. Im Falle der Ionenaustausch-

chromatographie kann die Detektion über die Fluoreszenz des König-Produkts erfolgen [TTTT184]. In neueren Veröffentlichungen kommt allerdings meist ein elektrochemischer Detektor mit einer Ag-WE unter Verwendung von Pulsamperometrie zum Einsatz [CJA05, CR07]. Elektrochemische Detektion mit Ag-WE wird auch in vielen anderen Apparaturen eingesetzt. Pihlar und Kosta bestimmten Cyanid amperometrisch durch kontinuierliche Destillation und Fließinjektionsanalyse (FIA) [PK80]. Nagy und Nagy verwendeten eine Detektionskammer ähnlich den in Kapitel 2.13.2 vorgestellten Aufbauten [NN93]. Auch die Quecksilbertropfelektrode wird in der aktuellen Forschung für polarographische und differenzpulsvoltammographische Methoden eingesetzt [dNBdC98, GLFMVP⁺00]. Potentiometrische Messungen von Cyanid können über ionenselektive Elektroden (ISE) erfolgen, die z. B. aus Ag-Chalkogenidglas oder AgI/Ag₂S bestehen [Tur10]. Dies nutzten Merkoçi et al. aus, um unter Beimischung von β -Glucosidase zu einer AgI/Ag₂S-Elektrodenmischung einen Sensor für das CG Amygdalin zu entwickeln [MBFA99].

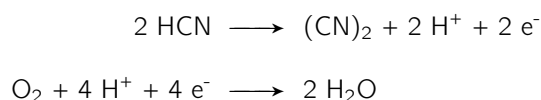
Die dargestellten Methoden stellen nur eine kleine Auswahl dar. Weiterführende Informationen finden sich in den Übersichtsarbeiten von Mak et al. [MYR05a], Lindsay, Greenbaum und O'Hare [LGO04] sowie Bark und Higson [BH63].

1.3.9 Kommerzielle Sensoren und Kits

Es sind etliche Produkte kommerziell erhältlich, die den Blausäuregehalt der Luft bzw. den Cyanidgehalt in Lösungen messen. Der „Merckoquant Cyanid-Test“, Artikelnummer 1.10044.0001 (Merck, Darmstadt), bedient sich der Farbreaktion nach König (siehe Kapitel 2.12.1), allerdings ohne zuvor das Cyanid abzutrennen. Dementsprechend ist die Anzahl der störenden Stoffe hoch (u. a. Ag⁺, I⁻, Cu²⁺, Hg⁺, Hg²⁺, SCN⁻). Der Test wird von Merck als semiquantitativ bezeichnet, die Bestimmungsgrenze beträgt 38 μ M.

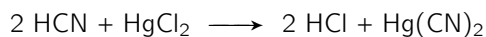
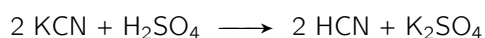
Für einen Küvettentest der Firma Hach Lange (Düsseldorf) mit der Artikelnummer LCK315, der ebenfalls auf der König-Reaktion beruht, wird eine Bestimmungsgrenze von 0,38 μ M angegeben.

Die Firma Dräger (Lübeck) bietet zwei Produkte an. Der „DrägerSensor®“ in den Ausführungen XS EC HCN, Artikelnummer 68 09 150, und XXS HCN, Artikelnummer 68 10 887, stellt einen amperometrischen Sensor für die Gasphase dar und ist für den Einsatz in geeigneten Geräten der Firma Dräger konzipiert. Der Bestimmungsbe-
reich liegt zwischen 1–50 ppm. Im Falle des Sensors XS EC HCN wird an der Anode Blausäure zu Dicyan oxidiert, während an der Kathode Sauerstoff reduziert wird:



Für die Ausführung XXS HCN sind keine Informationen zum Messprinzip verfügbar. Bei beiden Ausführungen werden unter anderem Phosphin, Chlor, Schwefelwasserstoff und Stickstoffdioxid als Störungen angegeben.

Zur Bestimmung von Kalium- bzw. Natriumcyanid-Aerosolen in einem Konzentrationsbereich von 2–15 mg·m³ in Luft bietet Dräger das Prüfröhrchen mit der Bezeichnung „Cyanid 2/a (67 28 791) Dräger-Röhrchen®“ an. Nach Einsaugen einer definierten Luftmenge mittels einer speziellen Pumpe wird Cyanid im Röhrchen zunächst protoniert und im Luftstrom zu einer mit HgCl₂ und Methylrot präparierten Zone transportiert. Durch Reaktion mit Quecksilber-II-chlorid wird HCl freigesetzt, was einen Farbumschlag des Indikators Methylrot bewirkt:



Von der Firma Thermo Fisher Scientific (Bonn) sind ISE für potentiometrische Cyanidbestimmungen in verschiedenen Ausführungen erhältlich, darunter auch Einstabmessketten. Die Messung beruht auf einer Potentialänderung, die durch den Einfluss von Cyanid auf Silberiodid hervorgerufen wird. Als Bestimmungsbereich wird 8 µM - 100 mM angegeben.

1.3.10 Enzymatische und biosensorische Bestimmungsverfahren

Die biologischen Komponenten der enzymatischen und biosensorischen Verfahren zur Bestimmung von Cyanid können in die Gruppen ganze Zellen und Enzyme aufgeteilt werden. Beide Gruppen können nochmals unterteilt werden, indem unterschieden wird, ob die biologische Komponente durch Cyanid gehemmt wird oder ob sie Cyanid abbaut. Als physikalische Elemente dieser Sensoren kommen meist elektrochemische, seltener photometrische Methoden zum Einsatz. Ein Sensor bedient sich eines Thermistors. Die verschiedenen Sensortypen werden nun im Einzelnen dargestellt.

Nakanishi, Ikebukuro und Karube verwendeten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*). Deren Stoffwechsel wird durch Cyanid gehemmt, was sich in einem verminderten Sauerstoffverbrauch niederschlägt. Dieser wurde durch eine Clark-Elektrode quantifiziert [NII96]. Ikebukuro et al. entwickelten dieses Prinzip weiter zu einem Fließsystem [IHN⁺96] und zu einem Sensor zur Flusswasseranalyse [IMC⁺96]. Das gleiche Prinzip wurde von Filipović-Kovačević, Mikšaj und Šalamon zur Analyse von Obstbränden angewendet [FKMv02].

Die Fähigkeit von *Pseudomonas fluorescens*, Cyanid unter Sauerstoffverbrauch abzubauen, wurde von Lee und Karube ausgenutzt. Wiederum wurde eine Clark-Elektrode verwendet [LK95]. Weiterentwicklungen dieses Prinzips zu einem Gassensor und einem Durchflusssystem wurden ebenfalls von Lee und Karube vorgenommen [LK96a, LK96b].

Ein Nachteil der Verwendung ganzer Zellen besteht darin, dass der Stoffwechsel und damit der Sauerstoffverbrauch stark von verschiedenen Stoffen wie Glucose oder Glutaminsäure beeinflusst wird [MLT⁺05]. Im Falle der Stoffwechselhemmung gibt es zudem eine Vielzahl anderer Stoffe, die ebenfalls toxisch auf Zellen wirken und so Cyanid vortäuschen können.

Es sind weiterhin einige Sensoren beschrieben, welche die Hemmung von Enzymen durch Cyanid ausnutzen. Durch Verwendung von Cytochrom-*c*-Oxidase wird das Enzym verwendet, das auch im menschlichen Körper Angriffspunkt von Cyanid ist. Zwei amperometrische Sensoren mit immobilisierter Cytochrom-*c*-Oxidase sind veröffentlicht. Während der Sensor von Albery et al. nicht wiederverwendbar ist [ACMS90], konnten Amine et al. einen Aufbau zeigen, der über zwei Monate wiederholt für Messungen verwendet werden konnte [AAKP95]. Beide Sensoren reagierten allerdings auch auf Azid und Sulfid.

Verschiedene Sensoren bauen auf der Hemmung von Meerrettichperoxidase durch Cyanid auf. Dabei wurden jeweils unterschiedliche elektrochemische Verfahren zur Detektion verwendet. Smit und Cass bedienten sich eines Ping-Pong-Mechanismus, wobei Meerrettichperoxidase durch amperometrisch generiertes Wasserstoffperoxid oxidiert wird und ihrerseits reduziertes Ferrocen oxidiert [SC90]. Das oxidierte Ferrocen wird an einem zweiten amperometrischen Aufbau wieder reduziert. Cyanid stört diesen Kreislauf, was sich in einem verminderten Stromfluss niederschlägt. Der verminderte Abbau von Wasserstoffperoxid durch Meerrettichperoxidase unter Cyanideinfluss wurde von Tatsuma und Oyama mittels einer Potential-Schritt-Technik [TO96] und von Park, Iwuoha und Smith mittels Amperometrie gemessen [PIS97]. Volotovskiy und Kim benutzten einen ionenselektiven Feldeffekttransistor, um die pH-Änderung, welche durch die Peroxidase-vermittelte Reaktion von Ascorbinsäure mit Wasserstoffperoxid entsteht, in Abhängigkeit von Cyanid zu bestimmen [VK98]. Störungen durch andere Ionen wie Azid wurden nicht berichtet. Lediglich Sulfid beeinflusste vorübergehend den Ferrocen-basierten Sensor. Die Entwicklung des empfindlichsten Sensors auf Basis von Meerrettichperoxidase gelang Shan, Cosnier und Mousty mit einer Nachweisgrenze von 5 nM [SCM04].

Das dritte Enzym, dessen Hemmung zur Quantifizierung von Cyanid diene, ist Polyphenoloxidase. Ein von Smit und Rechnitz veröffentlichter Sensor benutzte Hexacyanidoferrat-II, um Elektronen auf Polyphenoloxidase zu übertragen [SR93]. Die Menge des dadurch gebildeten Hexacyanidoferrat-III wurde elektrochemisch durch Pulsamperometrie bestimmt, was einen Rückschluss auf die Enzymaktivität zuließ. Allerdings konnte der Sensor nach Inhibition des Enzyms durch Cyanid nicht wiederverwendet werden. Zudem inhibierte auch Azid das Enzym. Smit und Rechnitz vermuteten noch weitere Inhibitoren, so dass auch weitere Substanzen durch den Sensor erfasst würden und keine gute Selektivität bezüglich Cyanid vorläge. Hu und Leng maßen amperometrisch die Menge an aus Catechol gebildetem Benzochinon, um die Aktivität bzw. Hemmung von Polyphenoloxidase zu bestimmen [HL95]. Ihr Sensor konnte für mehrere Messungen verwendet werden, wurde aber durch Phenol und Ascorbinsäu-

re gestört. Wesentlich mehr Störungen betrafen den Sensoraufbau von Besombes et al. [BCLR95]. Da auch verschiedene Pestizide und Chlorphenole eine Hemmung der Polyphenoloxidase bewirkten, wurde der Sensor nicht als reines Instrument zur Cyaniderrfassung, sondern vielmehr zur allgemeinen Detektion von Wasserverschmutzung vorgeschlagen. Es stellt sich hier die Frage, inwiefern diese Stoffe auch von anderen, auf Polyphenoloxidase basierenden Sensoren erfasst werden. Die bereits erwähnte Störung durch Azid trat jedoch bei einem von Wang et al. entwickelten Sensor nicht auf [WTL⁺98]. Der von Shan, Mousty und Cosnier gezeigte, auf Polyphenoloxidase basierende amperometrische Cyanidsensor besitzt möglicherweise den Nachteil, nur bedingt wiederverwendbar zu sein, da in der empfindlichsten Konfiguration des Sensors nach einer Messung und einem Spülschritt lediglich 44 % der ursprünglichen Enzymaktivität verblieben war. Bemerkenswert ist allerdings die extrem niedrige Nachweisgrenze von 0,1 nM, die den bereits sehr empfindlichen Sensor auf Basis von Meerrettichperoxidase der gleichen Arbeitsgruppe übertrifft [SMC04]. Weiterhin wurde von dieser Arbeitsgruppe ein Sensor veröffentlicht, der die Hemmung von Laccase durch Cyanid ausnutzt [MVC07]. Dieser Sensor reagierte allerdings auch auf Fluorid und Azid.

Der umgekehrte Weg unter Einsatz von cyanidabbauenden Enzymen und anschließender Detektion eines Produkts wurde ebenfalls von vielen Autoren beschrieben. Fonong benutzte Rhodanase zusammen mit $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, um anschließend $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ photometrisch zu bestimmen [Fon87]. Mak, Yanase und Renneberg nutzten ebenfalls die Lichtabsorption eines Produkts, das nach einer Reaktionskaskade unter Beteiligung von drei Enzymen gebildet wurde. Durch Cyanidhydratase gebildetes Formamid wurde von Formamidase zu Formiat umgesetzt, das danach von FDH zu Kohlendioxid oxidiert wurde. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert, das bei 340 nm [MYR05b] bestimmt wurde. Ebenfalls auf drei Enzymen basiert ein Assay von Ikebukuro et al. Das durch Rhodanase gebildete Sulfit wird durch Sulfitoxidase zu Sulfat oxidiert, wobei Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. Zusammen mit diesem wird Luminal unter Katalyse durch eine Peroxidase zu Chemolumineszenz angeregt [ISO⁺96]. Groom und Loung nutzten die ersten beiden Enzyme der eben erwähnten Kaskade, verzichteten aber auf Peroxidase und bestimmten stattdessen das entstandene Wasserstoffperoxid amperometrisch [GL91]. Mattiasson und Mosbach sind bislang die einzigen Forscher, die eine biosensorische Bestimmung von Cyanid über Thermistoren realisierten. Sie konnten zeigen, dass die Messung der Reaktionswärme beim Umsatz von Cyanid sowohl unter Einsatz von Cyanoalanin-Synthase als auch Rhodanase zur Quantifizierung geeignet ist [MMS77]. Mak et al. zogen wiederum eine Reaktionskaskade mit drei Enzymen heran. Das durch Cyanidase aus Cyanid entstandene Formiat wird hierbei durch FDH oxidiert, wobei NADH entsteht. Dieses wird durch Salicylathydroxylase wieder zu NAD^+ regeneriert. Salicylathydroxylase verbraucht dabei Salicylat und Sauerstoff. Mak et al. bestimmten den Sauerstoffverbrauch mit einer Clark-Elektrode [MLT⁺05].

In der AG Keusgen, in der auch die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, wurden bereits verschiedene Cyanid-Biosensoren unter Verwendung von Cyanidase entwickelt.

Tabelle 1.2: Charakteristika existierender Enzym- und Biosensoren für Cyanid, Konzentrationsangaben von Nachweisgrenze (LOD) und linearem Bereich (lin. Ber.) in μM .

Kurzbeschreibung	LOD [μM]	lin. Ber. [μM]	Haltbarkeit	Referenz
Stoffwechselhemmung ganzer Zellen				
Abnahme O_2 -Verbrauch von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,15	0–15	16 d	[IHN ⁺ 96]
Abnahme O_2 -Verbrauch von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		3,8–30	14 d	[FKMv02]
Cyanidabbau durch ganze Zellen				
Abnahme O_2 durch Umsatz mit <i>Pseudomonas fluorescens</i>		1,9–38	>30 d	[LK96b]
Hemmung von Enzymen				
Cytochrom-c-Oxidase		0,5–?	>60 d	[AAKP95]
Cytochrom-c-Oxidase		0,4–?	1 Mess.	[ACMS90]
Meerrettichperoxidase	0,2	10–1000		[TO96],
Meerrettichperoxidase	? ^a		180 d	[SC90]
Meerrettichperoxidase	0,5	4–40	>7 d	[PIS97],
Meerrettichperoxidase		0,1–1000		[VK98]
Meerrettichperoxidase	0,005	0,005–0,04	1 Mess. ?	[SCM04]
Polyphenoloxidase	? ^a		1 Mess.	[SR93]
Polyphenoloxidase		0,2–40	>120 d	[HL95]
Polyphenoloxidase	0,02	0,02–1	54 d ^b	[BCLR95]
Polyphenoloxidase	2	?–50		[WTL ⁺ 98]
Polyphenoloxidase	0,0001	0,002–0,05	1 Mess. ?	[SMC04]
Laccase	0,006			[MVC07]
Cyanidabbau durch Enzyme				
Umsatz mit Rhodanase, FeSCN photometrisch	3,8	?–770		[Fon87]
Umsatz mit Cyanidhydratase, Formamidase und FDH, NADH photometrisch	1,1	10–100		[MYR05b]
Umsatz mit Rhodanase und Sulfitoxidase, Chemolumineszenz (H_2O_2 /Luminol)	0,012	0,12–3,8	150 Mess.	[ISO ⁺ 96]
Thermistor mit Cyanoalanin-Synthase oder Rhodanase		20–100	200 h	[MMS77]
H_2O_2 amperometrisch nach Umsatz mit Rhodanase + Sulfitoxidase		5–1000	>18 h	[GL91]
O_2 -Verbrauch (Clark-Elektrode) nach Umsatz mit Cyanidase, FDH und Salicylathydroxylase	7,3	30–300	7 d ^c	[MLT ⁺ 05]
Ammoniakelektrode (potentiometrisch) nach Umsatz mit Cyanidase	6	20–300	Wochen	[KKK ⁺ 04]
pH-Änderung (EIS-Struktur) nach Umsatz mit Cyanidase	? ^d	1–100		[KKK ⁺ 04]
pH-Änderung (EIS-Struktur) nach Umsatz mit Cyanidase		1–10000		[TKC ⁺ 07]

^aAngabe „submicromolar range“, ^bnoch 20 % des anfänglichen Signals nach 54 d, ^cWert des zugrunde liegenden Formiatensensors der gleichen Arbeitsgruppe [MWSR03], ^dAngabe „nanomolar range“

Zum einen wurde das durch Cyanidase entstandene Ammoniak mit einer Ammoniak-elektrode gemessen [KKK⁺04]. Zum anderen wurde Cyanidase in einer Kooperation mit der AG Schöning (FH Aachen) von Turek et al. auf einer pH-sensitiven, kapazitiven Elektrolyt-Isolator-Silizium-Struktur (EIS-Struktur) immobilisiert. Die Änderung des pH-Werts durch den Umsatz von Cyanid zu Formiat und Ammoniak diente hier zur Gehaltsbestimmung [TKC⁺07].

1.4 Kompatible Solute

Versuche, die Stabilität der in dieser Arbeit verwendeten Cyanidase zu erhöhen, wurden auch unter Einsatz von so genannten kompatiblen Soluten durchgeführt. Dabei handelt es sich um meist kleinere Moleküle, die entweder ungeladen oder als Zwitterionen insgesamt ladungsneutral sind und in Wasser eine sehr hohe Löslichkeit besitzen. Sie werden von Mikroorganismen bei hoher Osmolarität der Umgebung, aber auch bei Stress wie z. B. durch extreme Temperaturen produziert. Die Stoffe erhöhen den osmotischen Druck innerhalb der Zelle, stören dabei aber Stoffwechselprozesse nicht [Bro76]. Der Name „kompatible Solute“ beruht auf einem Vorschlag von Brown und Simpson [BS72]. Beispiele solcher Moleküle sind Zucker (z. B. Saccharose), Aminosäuren (z. B. Prolin), Derivate von Aminosäuren (Ectoin, Hydroxyectoin, Abbildung 1.12) und Polyalkohole (z. B. Glycerol).

Diese Moleküle erhöhen nicht nur den osmotischen Druck, sondern sind in hoher Konzentration auch in der Lage, Enzyme vor Denaturierung zu schützen. Die allgemein anerkannte Erklärung dafür ist, dass Enzyme in ihrer wirksamen Form meist den geringsten Raum einnehmen, wohingegen eine Entfaltung der Proteine zu Denaturierung und somit Wirkverlust führt. Kompatible Solute gehen mit dem Peptidrückgrad abstoßende Wechselwirkungen ein, so dass sich der Raum, der den kompatiblen Soluten zur Verfügung steht, bei Anwesenheit von Proteinen verringert. Dieser Abnahme in der Entropie des Systems wirken Proteine entgegen, indem sie bevorzugt in der kleinstmöglichen Packung vorliegen. Ausgehend von Arbeiten von Arakawa und Timasheff wird dieses Modell „preferential exclusion model“ genannt [AT85]. Bolen und Baskakov arbeiteten dieses Modell weiter aus und schlugen für den thermodynamischen Effekt der abstoßenden Wechselwirkungen die Bezeichnung „osmophober

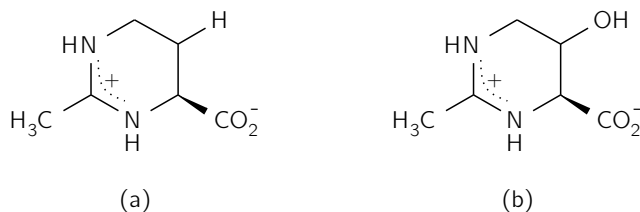
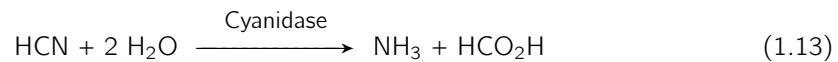


Abbildung 1.12: (a) Ectoin, (b) Hydroxyectoin.

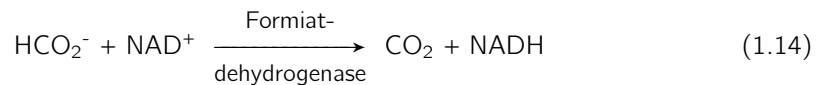
Effekt“ (*osmophobic effect*) vor [BB01]. *In vitro* können compatible Solute genutzt werden, um Proteine in Lösung zu stabilisieren. Dies ist für eine Reihe von Enzymen bewiesen [LG92, GG99]. Jedoch kann nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass sämtliche compatible Solute grundsätzlich stabilisierend auf alle Proteine wirken [BRR⁺02].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

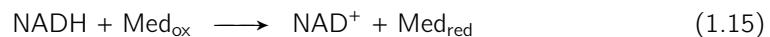
Auf Grundlage der nachfolgend dargestellten Reaktionskaskade sollte ein amperometrischer Biosensor für Cyanid entwickelt werden, der sich insbesondere zur Gehaltsbestimmung von Cyanid in cyanogenen Pflanzen eignet. Die Enzyme und die damit verbundenen Reaktionen des biologischen Teils des Sensors wurden bereits in der Einleitung vorgestellt. Sie werden hier aber zur Übersicht nochmals aufgeführt. Durch Hydrolyse von Blausäure entstehen Ammoniak und Ameisensäure. Das Enzym Cyanidase katalysiert diese Reaktion:



FDH oxidiert die entstandene Ameisensäure bzw. deren korrespondierende Base Formiat zu Kohlendioxid, wobei NAD^+ als Cosubstrat zu NADH reduziert wird:



Ein Redoxmediator nimmt in der oxidierten Form (Med_{ox}) Elektronen von NADH auf und wird dabei in die reduzierte Form überführt (Med_{red}). NADH wird dabei wieder zu NAD^+ oxidiert:



Rekombinante Cyanidase sollte mittels transformierter *E. coli* in genügender Menge und Reinheit hergestellt werden. Nach einer Charakterisierung des Enzyms bezüglich kinetischer Parameter sowie Stabilität sollte es auf der ersten Stufe dieser Kaskade eingesetzt werden. Anschließend sollte untersucht werden, welche Reaktionsprodukte der Kaskade sich für eine amperometrische Bestimmung eignen, wobei nicht notwendigerweise alle Stufen zum Einsatz kommen mussten. Im Falle der Bestimmung von NADH sollte jedoch ein geeigneter Mediator gefunden werden.

Der endgültige Aufbau der Messapparatur sollte nicht laborgebunden sein, sondern Vor-Ort-Messungen ermöglichen. Als Zwischenschritt zum Erreichen dieses Ziels war ein Durchflusssensor vorgesehen, mit dem die Eignung des zugrunde liegenden Messprinzips für die Bestimmung von Cyanid bewiesen werden sollte. Ferner sollten entwickelte Sensoraufbauten bezüglich Sensitivität, Selektivität, Robustheit und Stabilität vollständig charakterisiert und die Richtigkeit der Gehaltsbestimmung von Cyanid in Realproben durch Vergleich mit einer Standardmethode überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen

In Tabelle 2.1 sind die Kontaktdaten der Firmen hinterlegt, von denen Chemikalien, Geräte oder Sonstiges bezogen wurden. Die Firmen werden im Folgenden mit den in der Tabelle aufgeführten Kurzformen referenziert.

Tabelle 2.1: Bezugsquellen

Kurzform	Adresse
Acros	Teil von Sigma-Aldrich
Aldrich	Teil von Sigma-Aldrich
Amersham	Amersham Pharmacia, Teil von GE Healthcare
AppliChem	AppliChem GmbH, Ottoweg 4, 64291 Darmstadt
Bandelin	Bandelin electronic, Heinrichstraße 3-4, 12207 Berlin
Beckman Coulter	Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, 47807 Krefeld
Branson	Branson Ultrasonics Corporation, 1 Eagle Rd., Danbury, CT 06813-1961 USA
BST	BST - Bio Sensor Technology GmbH, Buchholzer Str. 55-61, 13156 Berlin - Niederschönhausen
BVT	BVT Technologies, a.s., Hudcova 78c, 612 00 Brno, Tschechische Republik
Caelo	Caesar & Loretz GmbH, Herderstrasse 31, 40721 Hilden
Fluka	Teil von Sigma-Aldrich
G-Biosciences	G-Biosciences, 92 Weldon Parkway, Maryland Heights, MO 63043-3202, USA
GE Healthcare	GE Healthcare, Oskar-Schlemmer-Str. 11, 80807 München
Gilson	Gilson, Inc., 3000 Parmenter Street, P.O. Box 620027, Middleton, WI 53562-0027, USA
Gizeh	GIZEH Raucherbedarf GmbH, Bunsenstraße 12, 51647 Gummersbach
Ismatec	ISMATEC SA, Labortechnik - Analytik, Feldeggstrasse 6, 8152 Glattbrugg, Schweiz
<i>Fortsetzung nächste Seite</i>	

Fortsetzung	
Kurzform	Adresse
JFC	ehemals Jülich Fine Chemicals, nun übernommen von Codexis, Inc., 200 Penobscot Drive, Redwood City, CA 94063, USA
KMF	ehemals KMF Laborchemie, nun Teil von VWR
Merck	Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt
Palm Instruments	Palm Instruments BV, Ruitercamp 119, 3992 BZ Houten, Niederlande
Riedel-de-Haën	Teil von Sigma-Aldrich
Roth	Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
Sarstedt	SARSTEDT AG & Co, Rommelsdorfer Straße, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
Sartorius	Sartorius AG, Weender Landstrasse 94-108, 37075 Göttingen
Schleicher & Schuell	Teil von Whatman (inzwischen GE Healthcare)
Schott	SI Analytics GmbH, Hattenbergstraße 10, 55122 Mainz
Serva	SERVA Electrophoresis GmbH, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg
Sigma-Aldrich	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen
Systec	Systec GmbH, Labor-Systemtechnik, Sandusweg 11, D-35435 Wettenberg
Thermo	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Adenauerallee 113, 53113 Bonn
VWR	VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt
Whatman	Teil von GE Healthcare

2.2 Geräte

2.2.1 Potentiostat, Elektroden und Zubehör

Als Elektroden wurden per Dickschichttechnik auf Keramikchips aufgebrachte amperometrische Anordnungen mit einer WE, einer RE und gegebenenfalls (nur bei Chips der Firma BVT) einer AE eingesetzt. Abbildung 2.1 zeigt exemplarisch einen Elektrodenchip der Firma BVT. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die verwendeten Typen. Beim in der Tabelle mit „Graphit 1“ bezeichneten Material der WE der Elektroden vom Typ W4 handelte es sich um Graphitpaste vom Typ 7101 der Firma DuPont (Bristol, England). Analog handelt es sich bei der Bezeichnung „Graphit 2“ um die Graphitpaste 7105 (ebenfalls DuPont). Die genaue Zusammensetzung ist lediglich

Tabelle 2.2: Verwendete Elektroden

Kurzform	Typ	WE	RE	AE	Firma
W2	AC1.W2.R1	Pt	Ag/AgCl	Pt	BVT
W4	AC1.W4.R1	Graphit 1	Ag/AgCl	Pt	BVT
W5	AC1.W5.R1	Graphit 2	Ag/AgCl	Pt	BVT
BST/C	101 00 00 00	C	Ag/AgCl	-	BST

der Firma selbst bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die Paste hauptsächlich aus Graphit besteht, dem organische Materialien zugemischt wurden, um die gewünschte Konsistenz zu erhalten [KKX09].

Für Elektroden der Firma BVT wurde eine Chiphalterung (*connector*) vom Typ KA 1.3 (BVT) verwendet. Eine Flusszelle vom Typ FC 2.3 (BVT) ermöglichte Durchflussmessungen nach dem Wall-Jet-Prinzip. Die Flusszelle für Elektrodenchips der Firma BST wurde von BST bezogen, die Artikelnummer war 1 410 00 00 00.

Der Potentiostat war vom Typ PalmSens und arbeitete mit der Firmware V. 3.8. Kontrolliert wurde er entweder von einem PC mit der Software PSLite (V. 1.6) oder von einem PocketPC mit der Software PalmTime (V. 1.51, amperometrische Messungen) bzw. PalmScan (V. 1.51, CV). Potentiostat und Softwarepakete kamen von Palm Instruments.

2.2.2 Sonstige

Die Typenbezeichnungen und Hersteller der verwendeten Geräte mit Ausnahme des elektrochemischen Setups sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Gerät	Beschreibung
Analysenwaage	CP225D-0CE (Sartorius)
Autoklav	Tuttnauer 3850 EL (Systec)
Dialyseschlauch / -membran	Servapor [®] , Ø 21 mm, 12 000–14 000 MWCO (Serva)
Dialysegefäß	Tube-O-DIALYZER, 200 µL - 2,5 mL, 1 000 MWCO (G-Biosciences)
Faltenfilter	5951/2, Ø 240 mm, Ref. No. 311 651 (Schleicher & Schuell)
FIA	siehe Kapitel 2.6
FPLC	Äkta FPLC mit UV-Detektor bei 280 nm (Amersham), kontrollierende Software: Unicorn V. 3.10
Mikrotiterplattenreader	Multiskan EX (Thermo)

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung	
Gerät	Beschreibung
NHS-aktivierte Kartuschen	HiTrap™ NHS-activated HP 1 mL (GE Healthcare)
Komplexierende Kartuschen	HiTrap™ Chelating HP 1 / 5 mL (GE Healthcare)
pH-Meter	Lab 850 mit pH-Elektrode BlueLine 28 pH (Schott)
Photometer	Nicolet evolution 100 (Thermo)
Probenröhrchen für FIA	No./REF 55.475 (Sarstedt)
Pumpenschläuche	Tygon R3607 (ID 0,51 mm, orange/gelb), Tygon R2001 (ID 0,38 mm, orange/grün), Ismatec
Schlauchpumpen	Minipuls 3 (Gilson)
Sonicator	Branson Sonifier® 250 (Branson)
Spritzenvorsatzfilter, steril	z. B. Anotop™ 10 (Whatman) oder vergleichbar mit Porengröße 0,2 µm
Sterilbank	Heraeus HeraSafe (Thermo)
Ultraschallbad	Sonorex RX 100 H (Bandelin)
UV-Durchflusssdetektor	Merck Hitachi UV-Monitor 655A-22 (Merck)
Zentrifuge	Avanti J-25 (Beckman Coulter)

2.3 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien mit Ausnahme der Enzyme sind unter Angabe von Reinheitsgrad und Bezugsquelle in Tabelle 2.4 aufgeführt. Gereinigtes Wasser wurde von einer hauseigenen Anlage durch eine Kombination von Ionentauscher und Umkehrosmose produziert. Sofern nicht anders angegeben, wurde dieses Wasser verwendet. Die Bezeichnung „H₂O p. a.“ dagegen bezieht sich auf das von Merck gelieferte Wasser zur Analyse (Tabelle 2.4).

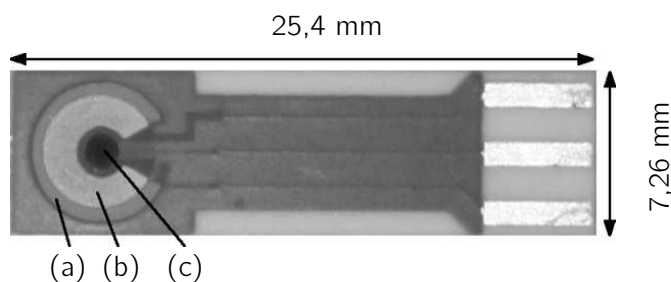


Abbildung 2.1: Elektrodenchip vom Typ W5. (a) AE, (b) RE, (c) WE. Der Abstand zwischen RE und AE beträgt ca. 0,2 mm und ist auf dem Bild nicht zu erkennen.

Tabelle 2.4: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Reinheitsgrad	Firma
Agar	rein	Acros
Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	für Biochemie	Merck
Alginsäure Natriumsalz	90,8 – 106 %	Acros
Ammoniumsulfat	p. a.	Merck
Ammoniumsulfat Suprapur	≥ 99,5 %	Merck
Ammoniumthiocyanat	p. a.	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	Min. 99 %	AppliChem
Amygdalae amarae tot. (Bittermandeln)	EB 6	Caelo
Barbitursäure	p. a.	Merck
Borsäure Suprapur	99,9999	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat Suprapur (wasserfrei)	99,99	Merck
Cadmiumsulfat Hydrat	p. a.	Sigma-Aldrich
Chloramin T	p. a.	Sigma-Aldrich
Cis-Platin, 65 % Pt	zur Synthese	Merck
Citronensäure, wasserfrei	p. a.	Merck
Cobalt-II-chlorid Hexahydrat	p. a.	Fluka
Cobalt-III-acetylacetonat	zur Synthese	Merck
Dichlormethan	für die GC	Merck
Durochinon	97 %	Aldrich
Ectoin	rein	bitop
Ethanol LiChrosolv (gradient grade für die Flüssigchromatographie)	siehe Name	Merck
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatrium (Na ₂ -EDTA)	99–101 %	Merck
Folin-Ciocalteus Phenolreagens	nicht angegeben	Fluka
Glycerol wasserfrei	≥ 98 %	Fluka
Hefeextrakt	für Biochemie	AppliChem
Hydroxyectoin	≥ 97 %	bitop
Imidazol	p. a.	Fluka
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	99 %	Acros
Kaliumchlorid	p. a.	Riedel-de-Haën
Kaliumcyanid	p. a.	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	reinst	Merck
Kaliumformiat	99 %	Aldrich
Kaliumhydroxid	p. a.	Roth
Kaliumhexacyanidoferrat-II (K ₄ [Fe(CN) ₆])	p. a.	Merck

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung		
Reagenz	Reinheitsgrad	Firma
Kaliumhexacyanidoferrat-III ($K_3[Fe(CN)_6]$)	p. a.	Merck
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	p. a.	Merck
Kupfer-II-sulfat Pentahydrat	reinst	Merck
Meldolablauf (MB)	nicht angegeben	Sigma
Natriumacetat wasserfrei	p. a.	Riedel-de-Haën
Natriumazid	99 %	Merck
Natriumcarbonat wasserfrei	p. a.	Merck
Natriumchlorid	p. a.	Merck
Natriumchlorid Suprapur	99,99	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	p. a.	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Suprapur (wasserfrei)	99,99	Merck
Natriumhydroxid	p. a.	KMF
Natriumhydroxid $\times H_2O$ Suprapur	99,99	Merck
Natriumsulfid	p. a.	Fluka
Nickel-II-sulfat-Hexahydrat	p. a.	Merck
Nicotinamadeninindinukleotid (NAD^+)	für Biochemie	Merck
o-Chloranil	rein	Fluka
Palladium-II-chlorid wasserfrei, 60 % Pd	purum	Fluka
Phthaldialdehyd (OPA) für die Fluoreszenzanalyse	$\geq 99 \%$	Merck
Pyrrol	98 %	Aldrich
Salzsäure 32 %	p. a.	Merck
Schwefelsäure 96 %	p. a.	Merck
Seesand	reinst	Merck
tert.-Butylmethylether (TBME)	für die HPLC	Sigma-Aldrich
Tetrafluoro-p-benzochinon	97 %	Aldrich
Thioglykolsäure	p. a.	Fluka
Trypton (Pepton aus Casein, pankreatischer Verdau)	für Biochemie	AppliChem
Wasserstoffperoxid 30 % (stabilisiert)	zur Synthese	Merck
Wasser	p. a.	Merck
Zink, Pulver, stabilisiert, Korngröße $< 45 \mu m$	p. a.	Merck
Zinksulfat Heptahydrat	reinst	Merck
Zinn-II-chlorid $\times H_2O$	p. a.	Merck

2.4 Enzyme

Bei der verwendeten Cyanidase handelte es sich um ein Enzym aus *Pseudomonas stutzeri* AK 61, das von Watanabe et al. erstmals beschrieben [WYIK98a] und näher untersucht [WYIK98b] worden war. Durch Arbeiten von Wolfgang Klein und Marc Goldbach [Gol02] war die Arbeitsgruppe im Besitz von transformierten *E. coli*, die ein Plasmid (Bezeichnung pWK401, Abbildung 2.2) mit für Cyanidase kodierender DNS enthielten. Dabei war die Aminosäuresequenz des Enzyms am N-Terminus um sechs Histidine erweitert worden, um eine einfache Aufreinigung zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung dieser Modifikation wies die Cyanidase ein Molekulargewicht von 39 032 Dalton auf. Im Rahmen einer Diplomarbeit waren von Kristina Kuhrmeyer enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt und Werte für v_{\max} von 905 bzw. 729 $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sowie für K_M von 0,6 bzw. 0,3 mM gefunden worden [Kuh03]. Das Plasmid enthielt zudem ein Gen, das für eine Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika kodierte. Details zur Vorgehensweise bei der rekombinanten Expression sowie der Aufreinigung sind in Kapitel 2.7 aufgeführt. Dauerkulturen der Bakterien wurden bei -80°C aufbewahrt.

FDH (EC 1.2.1.2) wurde in Lösung von JFC bezogen. Es handelte sich um rekombinant in *E. coli* hergestellte, NAD-spezifische FDH von *Pseudomonas spec.* mit der Bestellnummer 24.11 und der Chargenbezeichnung H52411.03. Die Aktivität betrug laut Deklaration $224 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\hat{=} 3,73 \mu\text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$). Es handelte sich bei dieser FDH

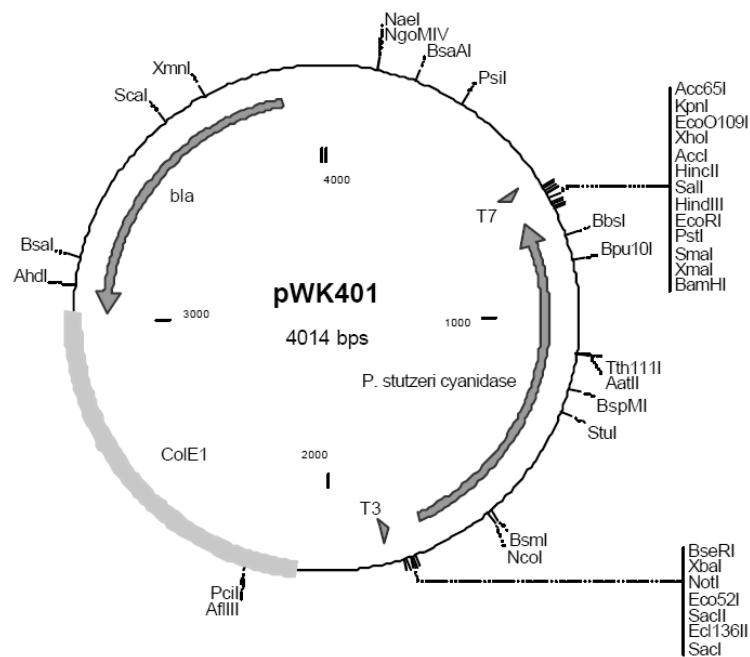


Abbildung 2.2: Restriktionskarte des Plasmids mit für Cyanidase kodierender DNS.

um eine Form ohne Metallion (Molybdän, Wolfram o. ä.) im aktiven Zentrum, was die Stabilität des Enzyms gegenüber Cyanid wesentlich erhöhen sollte.

Das zum Bakterienaufschluss verwendete Lysozym wurde von Fluka mit einer Aktivität von $69\,480\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ geliefert.

2.5 Lösungen

Tabelle 2.5 listet die verwendeten Lösungen auf. Die Angabe „Filtrieren“ bezeichnet eine Filtration bei einer Porengröße von $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

Tabelle 2.5: Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung
<i>Proteingehaltsbestimmung</i>		
Lowry A	Na ₂ CO ₃ 5 g NaOH 1 g	H ₂ O ad 50 mL
Lowry B	CuSO ₄ ×5 H ₂ O 100 mg	H ₂ O ad 10 mL
Lowry C	K-Na-Tartrat 200 mg	H ₂ O ad 10 mL
Lowry-Gebrauchslösung	Lowry A 20 VT Lowry B 1 VT Lowry C 1 VT	frisch herzustellen
<i>Mikrobiologie und FPLC</i>		
LB-Medium	Trypton 10,0 g Hefe-Extrakt 5,0 g NaCl 10,0 g	Bestandteile in etwas H ₂ O lösen, H ₂ O ad 1,0 L
LB-Agar	Trypton 2,5 g Hefe-Extrakt 1,25 g NaCl 2,5 g Agar 4 g	Bestandteile in Schott-Flasche (500 mL) geben, H ₂ O ad 250 mL, Rührfisch hinzugeben und autoklavieren, wobei sich der Agar löst
FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 0,15/0,15 M	NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 20,7 g NaCl 8,6 g	in 800 mL H ₂ O lösen, mit NaOH 5 M auf pH 7,0, H ₂ O ad 1,0 L, filtrieren
FPLC-Lösepuffer pH 7,0 0,15/0,15/0,2 M	NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 10,4 g NaCl 4,3 g Imidazol 6,8	in 400 mL H ₂ O lösen, HCl 32 % bis pH 7,0, H ₂ O ad 500 mL, filtrieren
<i>FIA</i>		
FIA-Fließmittel pH 7,0 0,16/0,17 M	NaH ₂ PO ₄ Supr. 7,7 g Na ₂ HPO ₄ Supr. 14,2 g NaCl Supr. 10,0 g	in 800 mL H ₂ O p. a. lösen, NaOH Supr. 5 M bis pH 7,0, H ₂ O p. a. ad 1,0 L, filtrieren
FIA-Boratpuffer pH 12 0,8 M	Borsäure Supr. 24,7 g	in 250 mL H ₂ O p. a. lösen, mit NaOH Suprapur 5 M auf pH 12,0, H ₂ O p. a. ad 500 mL
<i>Fortsetzung nächste Seite</i>		

2 Material und Methoden

<i>Fortsetzung</i>		
Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung
FIA-Reagenz	OPA für die Fluoreszenzanalyse 2,0 g Thioglykolsäure 2,7 mL	OPA in 800 mL H ₂ O p. a. geben, unter Abzug Thioglykolsäure hinzugeben und pH sofort mit NaOH Suprapur 5 M auf 9 einstellen, Rühren bis zum vollständigen Lösen des OPA, pH kontrollieren, H ₂ O p. a. ad 1,0 L
NaOH 30 mM	NaOH p. a. 1,2 g	H ₂ O ad 1,0 L
Cyanid-Lösung 0,4 M	KCN 26,05 mg NaOH 30 mM 1,0 mL	siehe Anmerkungen hierzu in Kapitel 2.8.3
<i>Isolierung von Cyanid aus Matrices</i>		
Zink- / Cadmiumsulfat-Lösung	Zinksulfat 100 g Cadmiumsulfat Hydrat 100 g	H ₂ O ad 1,0 L
Na ₂ -EDTA-Lösung	Na ₂ -EDTA 100 g	in 940 mL warmem H ₂ O lösen
Phthalat-Lösung	Kaliumdihydrogenphthalat 80 g	in 920 mL warmem H ₂ O lösen
SnCl ₂ -Lösung	Zinn-II-chlorid×H ₂ O 50 g HCl 1 M 40 mL	Zinnchlorid in HCl lösen, H ₂ O ad 100 mL
<i>König-Reaktion (Farbassay Cyanidbestimmung)</i>		
KH ₂ PO ₄ -Lösung 1,3 M	KH ₂ PO ₄ 17,86 g	H ₂ O ad 100 mL
Chloramin-T-Reagenz	Chloramin T 10 mg	H ₂ O ad 1,0 mL. Frisch herzustellen.
Pyr / Barb-Reagenz	Barbitursäure 120 mg Pyridin 600 µL HCl 32 % 140 µL H ₂ O ad 2,0 mL	Barbitursäure in Pyridin aufschütteln, HCl und Wasser zugeben und im Ultraschallbad bis zur Auflösung aller Teilchen behandeln. Frisch herzustellen.
<i>Sonstige</i>		
H ₂ SO ₄ dil. 0,2 N	H ₂ SO ₄ 96 % 5,5 mL	langsam zu 80 mL H ₂ O zugeben, dann H ₂ O ad 100 mL
Biosensor-Fließmittel pH 7,0 0,1/0,1 M	KH ₂ PO ₄ 27,2 g KCl 14,9 g	in 1,7 L H ₂ O lösen, mit KOH 1 M auf pH 7,0, H ₂ O ad 2,0 L, filtrieren
FDH-Lagerpuffer	(NH ₄) ₂ SO ₄ 19,0 g Na ₂ EDTA 744 mg KH ₂ PO ₄ 1,36 g	in 70 mL H ₂ O lösen, mit NaOH 5 M auf pH 7,0, H ₂ O ad 100 mL, filtrieren
<i>Fortsetzung nächste Seite</i>		

Fortsetzung			
Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
KCl / KOH-Lösung 0,1/0,03 M	KCl	7,46 g	mit H ₂ O auf 1,0 L auffüllen
	KOH	1,68 g	
Puffer-Alkali-Mischung	Biosensor-Fließmittel pH 7,0	30 mL	mit KCl / KOH auf 50,0 mL auffüllen
	NaOH 5 M	1,35 mL	

2.6 Fließinjektionsanalyse zur Ammoniak-Quantifizierung

Zur quantitativen Bestimmung von Ammoniak wurde eine FIA-Apparatur genutzt. Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Mittels einer Schlauchpumpe und je einem Pumpenschlauch mit einem Innendurchmesser (ID) von 0,51 mm wurden aus drei Vorratsbehältern jeweils FIA-Boratpuffer pH 12, FIA-Reagenz und FIA-Fließmittel pH 7,0 in die Anlage eingebracht. Die Flussrate betrug dabei pro Lösung ca. $1,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Hierbei durchfloss das FIA-Fließmittel pH 7,0 zunächst ein Injektionsventil und gegebenenfalls eine eingebaute Kartusche, bevor der Zusammenfluss mit FIA-Boratpuffer pH 12 und FIA-Reagenz erfolgte und die in Abbildung 2.4 dargestellte Reaktion von Ammoniak und Reagenz zu einem fluoreszierenden Produkt stattfand. Der im Flussrichtung nachfolgende Fluoreszenzdetektor strahlte mit einer Laserdiode Licht ein und bestimmte mit einem Einzelphotonenzähler die Frequenz der durch Fluoreszenz der durchfließenden Probe ausgestrahlten Lichtquanten (ausgegeben als *counts per second*, cps).

Proben wurden mit FIA-Fließmittel pH 7,0 verdünnt, wobei maximal 50 mL Probe pro L FIA-Fließmittel pH 7,0 verwendet wurden. Die Proben wurden in Probenröhr-

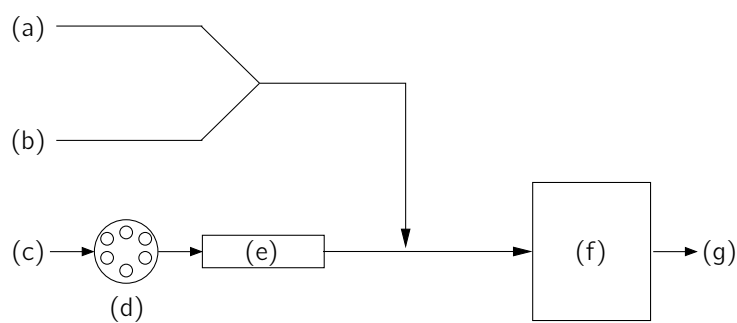


Abbildung 2.3: Aufbau FIA. (a) FIA-Boratpuffer pH 12, (b) FIA-Reagenz, (c) FIA-Fließmittel pH 7,0, (d) Injektionsventil (Schleife: 50 µL), (e) Einbaumöglichkeit HiTrap™-Kartusche, (f) Fluoreszenzdetektor, (g) Abfall.

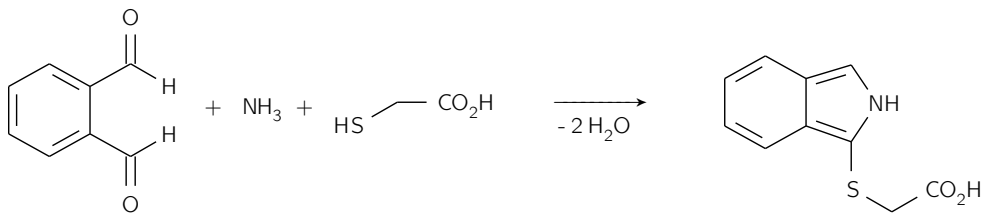


Abbildung 2.4: Reaktion von OPA, Ammoniak und Thioglykolsäure in der FIA zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat.

chen überführt und in ein Rack gestellt, wo sie automatisiert von einem Probengeber (Gilson) entnommen und in das Injektionsventil eingespritzt wurden.

Angesteuert wurde die Anlage per PC durch die Software MFA (V1.4 09/02) von Bodo Fuhrmann, die freies Programmieren von Methoden erlaubte. Die resultierenden Peaks wurden von der Software als Textdateien gespeichert und mittels selbstgeschriebener Software integriert.

2.7 Herstellung von Cyanidase

2.7.1 Herstellung von Agarplatten

Frisch hergestellter LB-Agar wurde noch heiß aus dem Autoklaven entnommen, unter einer Sterilbank auf einen Magnetrührer gestellt und bis auf etwa 40°C (handwarm) abkühlen gelassen. Bei dieser Temperatur wurde eine mittels eines sterilen Spritzenvorsatzfilters (Porengröße 0,2 μm) sterilfiltrierte, konzentrierte Lösung von Ampicillin-Natriumsalz in H_2O bis zu einer Endkonzentration von 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dem LB-Agar zugegeben. Sofort im Anschluss wurde der LB-Agar in sterile Kunststoffpetrischalen ausgegossen (250 mL ergaben ca. 16 Platten) und unter der Sterilbank weiter abkühlen gelassen. Nach ca. 2 h wurden die so hergestellten Agarplatten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt (Haltbarkeit: ca. eine Woche).

Cyanidase-produzierende *E. coli* wurden unter der Sterilbank aus Dauerkulturen mittels ausgeglühter Impföse entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet, danach mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert.

2.7.2 Bakterienaufzucht

Je 400 mL LB-Medium wurden in sechs mit Schikanen versehene Erlenmeyerkolben gefüllt. Als Verschluss der Kolben diente dreilagig gefaltete, handelsübliche Aluminiumfolie. Gleichzeitig wurden acht Reagenzgläser mit je 4 mL LB-Medium beschickt und mit CAP-O-TEST-Kappen verschlossen. Nach Autoklavieren und Abkühlen wurde

in jedes Gefäß wie schon bei der Herstellung der Agarplatten sterilfiltrierte, konzentrierte Ampicillin-Natriumsalz-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 100 mg·L⁻¹ gegeben.

Sieben der acht Reagenzgläser wurden unter der Sterilbank mittels Öse mit je einer *E. coli*-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft, das achte diente als Blindwert bei der photometrischen Vermessung. Sämtliche Reagenzgläser wurden über Nacht unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Am Tag darauf wurde der Inhalt der Reagenzgläser, soweit er durch Bakterienwachstum sichtbar trüb geworden war, unter der Sterilbank in die Erlenmeyerkolben überführt (je ein Reagenzglas pro Kolben). Die Kolben wurden unter Schütteln bei 37°C gehalten. Nach 3 h wurde begonnen, alle 20 min die Absorption des Mediums zu messen. Sobald die Absorption gegenüber bakterienfreiem Medium als Blindwert 0,9 überstieg, wurde eine sterilfiltrierte, konzentrierte Lösung von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach dieser Zugabe wurden die Kolben weitere 4,5 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurde das Medium 15 min bei einer Relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 2831 (4 000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Kolben zurückgegeben, autoklaviert und verworfen. Je ein Drittel des Rückstands wurde in 80 mL FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.7.3 Bakterienaufschluss

Eine Flasche mit 80 mL gefrorener Bakteriensuspension wurde unter warmem Wasser und ständigem Schütteln aufgetaut. Noch vor Abschluss des Auftauvorgangs wurde eine Spatelspitze Lysozym zugegeben, die Flasche erneut verschlossen und gut geschüttelt. Die vollständig aufgetaute Suspension wurde 2×1 min bei komplett eingetauchter Spitze mit einem Branson Sonifier 250 (Einstellungen: Output Control 4,5, 70 % Duty Cycle) sonifiziert. Nach Abzentrifugieren bei 4°C und einem RCF von 48 384 (20 000 rpm) wurde der Überstand mittels einer Schlauchpumpe auf eine mit Nickelsulfat beladene und mit Wasser sowie FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 gespülte¹ komplexierende Kartusche (5 mL) aufgebracht.

2.7.4 Aufreinigung

Die Aufreinigung erfolgte per Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Die Nickelsäule wurde in eine Äkta FPLC eingebaut und mit FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 bei einer Flussrate von 3 mL·min⁻¹ durchspült, wobei die Absorption bei 280 nm sowie die Leitfähigkeit überwacht wurden. Sobald die Absorption unter 0,04 gefallen war, wurde dem Fließmittel 10 % FPLC-Lösepuffer pH 7,0 zugemischt, um Verunreinigungen abzulösen, die nur leicht an Nickel gebunden waren. Nachdem die Absorption erneut unter 0,04 gefallen war, wurde ohne Gradient auf 100 % FPLC-Lösepuffer

¹Vorsicht beim Spülen einer frisch beladenen Nickelsäule: Nickelphosphat ist schwer löslich, daher muss nach Beladen mit Nickel immer zuerst mit H₂O gespült werden.

pH 7,0 als Fließmittel umgeschaltet. Die Fraktion mit einer Absorption von $\geq 0,5$ wurde aufgefangen. Sie wird im Folgenden als Cyanidase-Lösung bezeichnet.

2.7.5 Anlegen von Dauerkulturen

Von einer Agarplatte mit frisch über Nacht angezüchteten Bakterien (siehe Kapitel 2.7.1) wurde eine Kolonie mittels Impföse in 4 mL autoklaviertes, mit sterilfiltrierter Ampicillin-Natriumsalz-Lösung (Endkonzentration $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) versetztes LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am Morgen danach wurde das Medium mit Glycerol² bis zu einem Volumenanteil von 20 % versetzt, in geeignete Behältnisse (z. B. Nunc[®] CryoTube[®] Vials der Firma Sigma-Aldrich) gegeben und bei -80°C gelagert.

2.8 Charakterisierung von Cyanidase

2.8.1 Proteingehaltsbestimmung nach Lowry

Eine Mikrotiterplatte wurde mit je 20 μL Wasser, verschiedenen Verdünnungen von Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA) in Wasser ($0,2\text{--}1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und der zu untersuchenden Cyanidase-Lösung nach dem in Tabelle 2.6 angegebenen Schema befüllt. Die Cyanidase-Lösung war gegebenenfalls durch Verdünnen mit H_2O (meist 1 auf 10) in den Absorptionsbereich der BSA-Standards gebracht worden. Nach Zugabe von 60 μL Lowry-Gebrauchslösung mittels Mehrkanalpipette, Mischen mit der Pipette durch wiederholtes Hochziehen und Ablassen, Warten von 15 min, Zugabe von 170 μL einer Verdünnung von Folin-Ciocalteus Phenolreagens (1 auf 10 mit H_2O), erneutem Mischen sowie Abwarten von 30 min wurde die Platte mit dem Mikrotiterplattenreader bei 580 nm photometrisch vermessen. Das Wasser sowie die BSA-Verdünnungen erlaubten das Aufstellen einer Kalibrationsgeraden, in welche die Absorptionen der Cyanidase-Verdünnungen eingesetzt werden konnten, um die Konzentration der Cyanidase zu berechnen.

Tabelle 2.6: Pipettierschema für Proteinbestimmung nach Lowry. Je Vertiefung 20 μL .

	1	2	3
A	H_2O	H_2O	H_2O
B	$\text{BSA } 0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{BSA } 0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{BSA } 0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
...
F	$\text{BSA } 1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{BSA } 1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{BSA } 1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
G	Cyanidase-Verdünnung	Cyanidase-Verdünnung	Cyanidase-Verdünnung

²Möglich ist statt Glycerol auch Dimethylsulfoxid mit einem Volumenanteil von 7 %.

2.8.2 Gravimetrische Proteingehaltsbestimmung

Ein Volumen von 5,0 mL einer Cyanidase-Lösung wurde in einen Dialyseschlauch gegeben und über vier Tage gegen 800 mL H₂O dialysiert, wobei das Wasser fünfmal gewechselt wurde. Danach wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs quantitativ in ein zuvor bei 104°C getrocknetes und auf der Analysenwaage konstant gewogenes Becherglas überführt und bei 90°C im Trockenschrank eingetrocknet. Nachdem makroskopisch keine Flüssigkeit mehr sichtbar war, wurde die Temperatur auf 104°C erhöht und das Becherglas mit dem getrockneten Protein erneut konstant gewogen. Die Masse an Protein wurde durch Differenzbildung der Masse des Becherglases mit und ohne Protein ermittelt.

2.8.3 Aktivitätsbestimmung mittels FIA

Da Cyanidase Cyanid unter anderem zu Ammoniak umsetzt, konnte die Aktivität mit der FIA-Apparatur zur Analyse des Ammoniakgehalts (Kapitel 2.6) ermittelt werden. Hierzu wurden 50 µL Cyanidase-Lösung in einem Analysenröhrchen vorgelegt, 3 850 µL FIA-Fließmittel pH 7,0 hinzugefügt und die Reaktion mit 100 µL Cyanid-Lösung 0,4 M gestartet.

Sofort nach der Zugabe der Cyanid-Lösung wurde das Röhrchen verschlossen und der Inhalt durch mehrfaches Umkippen gemischt. 30 s nach der Zugabe wurde eine PC-gesteuerte Methode gestartet, die dreimal in definierten Zeitabständen Proben aus dem inzwischen wieder geöffneten Röhrchen entnahm und in die Durchflussschleife injizierte.

Zudem wurden verschiedene Ammoniakstandards vermessen. Jede einzelne Messung ergab einen Peak, dessen Fläche mit einer selbstgeschriebenen Software berechnet und im Falle der Standards zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden (Steigung: Fläche pro Konzentration) verwendet wurde. Bei den Cyanidase-Proben wurden die Flächen ebenfalls zur Erstellung einer Geraden (Steigung: Fläche pro Zeit) benutzt. Mittels Division der Steigung der Cyanidase-Geraden durch die Steigung der Kalibrationsgeraden konnte die Aktivität der Cyanidase-Lösung errechnet werden.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Konzentration der so genannten „Cyanid-Lösung 0,4 M“ nicht exakt 0,4 M betrug, da bei der Herstellung nicht auf 1,0 mL aufgefüllt, sondern 1,0 mL zugegeben wurden (siehe Eintrag in Tabelle 2.5). Dies geschah aus den nachfolgend dargelegten Gründen. Zum einen sollten aus Sicherheitsgründen (siehe Kapitel 2.16) zumindest nicht routinemäßig mehr als 50 mg Kaliumcyanid gleichzeitig in Gebrauch sein, weshalb das Ansetzen einer größeren Menge der Lösung nicht in Frage kam. Zum anderen ist die Reproduzierbarkeit beim Auffüllen auf 1,0 mL, etwa in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß, wesentlich geringer als bei der Zugabe von 1,0 mL mit einer Kolbenhubpipette. Wichtig war auch nicht die präzise Kenntnis der Konzentration, sondern das Bereitstellen von immer der gleichen Konzentration bei jeder erneuten Durchführung der Aktivitätsbestimmung. Die Konzentration sollte dabei möglichst so hoch sein, dass das Enzym mit nahezu maximaler

Geschwindigkeit arbeitete und kleinere Änderungen in der Substratkonzentration nur geringfügige Änderungen der Aktivität ergaben. Mit einer ungefähren (aber immer gleichen) Endkonzentration von Cyanid im Analysenröhrchen von 10 mM wurden diese Ziele mit hinreichender Genauigkeit erreicht. Zuletzt sei zu diesem Thema bemerkt, dass sich 1,0 L Wasser durch Zugabe von 26 g Natriumchlorid, das Kaliumcyanid in Teilchenanzahl und Ladung sowie ungefähr auch in molarer Masse entspricht, um etwa 8 mL ausdehnt. Die Differenz dürfte also bei ca. 1 % und die reale Konzentration von Cyanid in Cyanid-Lösung 0,4 M bei ungefähr 0,396 M liegen.

2.9 Bestimmung der Aktivität von FDH

Zur Bestimmung der Aktivität von FDH in Lösung wurde die vom Hersteller (JFC) auf Anfrage zur Verfügung gestellte Vorschrift verwendet. In einer Halbmikroküvette wurden 800 μL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0), 100 μL NAD^+ -Lösung (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in Phosphatpuffer) und 100 μL Natriumformiat-Lösung (3 M in H_2O) gemischt. Die Küvette wurde 10 min in der auf 30°C eingestellten Halterung des Photometers temperiert. Anschließend wurden 20 μL einer Verdünnung von FDH (1 auf 100 mit Phosphatpuffer) zupipettiert, für 30 s mit der Pipette gemischt und die Absorption bei 340 nm aufgezeichnet. Aus der Auftragung der Absorption gegen die Zeit wurde mittels linearer Regression die Steigung berechnet.

Danach wurden die Absorptionen von Verdünnungen einer NADH-Stammlösung in Phosphatpuffer gemessen und hieraus eine Kalibrationsgerade erstellt. Die Aktivität wurde berechnet, indem die Steigung der FDH-Messung durch die Steigung der Kalibrationsgeraden dividiert wurde. Da JFC die Aktivität nicht durch Bezug auf eine Kalibration ermittelte, sondern einen festen molaren Absorptionskoeffizienten für NADH ($6\,220\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) verwendete, wurde diese Berechnung ebenfalls durchgeführt, um einen Vergleich zur deklarierten Aktivität zu haben.

2.10 NHS-aktivierte Kartuschen

2.10.1 Enzymimmobilisierung

In einem Kühlraum (4°C) wurde eine fabrikfrische NHS-aktivierte Kartusche (1 mL) mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Flussrate $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) zunächst mit 6 mL kühler Salzsäure (1 mM), dann mit 0,4 mL FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 durchspült. Sofort danach wurde die Kartusche mit 1,1 mL Enzymlösung beladen und aus dem Kühlraum entnommen. Nach 5 min Wartezeit bei Raumtemperatur wurden weitere 1,4 mL Enzymlösung bei einer Flussrate von ca. $0,1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ aufgebracht. Nach einer weiteren Wartezeit von 15 min wurde die Kartusche mit 6 mL des entsprechenden Lagerpuffers gespült und im Kühlschrank gelagert.

Vor dem Aufbringen von FDH wurden 2,5 mL Enzymlösung über 4 h in einem Dialysegefäß gegen $3\times 80\text{ mL}$ Biosensor-Fließmittel pH 7 dialysiert. Nach erfolgter

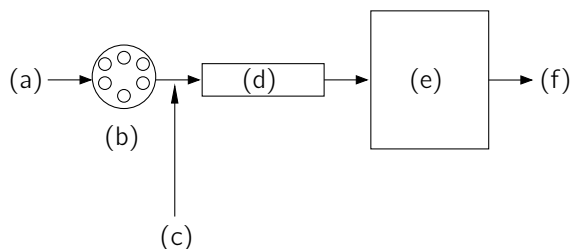


Abbildung 2.5: Aufbau zur Bestimmung der Umsatzrate der FDH-Kartusche. (a) Biosensor-Fließmittel pH 7,0 (ca. $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), (b) Injektionsventil ($300 \text{ } \mu\text{L}$), (c) NAD^+ -Zufluss (ca. $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 1 mM), (d) FDH-Kartusche, (e) UV-Durchflussdetektor, (f) Abfall.

Immobilisierung wurden die Kartuschen in FDH-Lagerpuffer gelagert. Die Lagerung von Cyanidase-Kartuschen erfolgte in FPLC-Lösepuffer pH 7,0.

2.10.2 Umsatzrate Cyanidase-Kartusche

Zur Bestimmung der Umsatzraten von Cyanidase-Kartuschen wurden die Kartuschen in die FIA zur Bestimmung von Ammoniak eingebaut, siehe Kapitel 2.6. Als Proben wurden Ammoniakstandard ($2,0 \text{ mM}$) sowie eine Mischung aus $20 \text{ } \mu\text{L}$ Cyanid-Lösung $0,4 \text{ M}$ und $3980 \text{ } \mu\text{L}$ FIA-Fließmittel pH 7,0 vermessen. Die Umsatzrate in Prozent wurde durch Quotientenbildung aus dem Durchschnitt der jeweiligen Peakflächen ermittelt. Die in Kapitel 2.8.3 diskutierte Abweichung der realen Konzentration der Cyanid-Lösung von $0,4 \text{ M}$ wurde hierbei vernachlässigt.

2.10.3 Umsatzrate FDH-Kartusche

Analog zur Bestimmung der Umsatzraten von Cyanidase-Kartuschen wurden für die FDH-Kartuschen NADH-Standards sowie Formiat, jeweils in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 in einer Konzentration von $400 \text{ } \mu\text{M}$, vermessen. Die hierfür herangezogene Apparatur ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Die Peaks wurden digital aufgezeichnet, um nach Integration den Quotienten aus den Flächen der Formiat- und NADH-Peaks zu berechnen. Dieser Quotient stellte die Umsatzrate in Prozent dar.

2.11 Extraktion von Cyanid aus Pflanzenteilen

Etwa $0,7\text{--}1,2 \text{ g}$ Pflanzenmaterial wurden genau gewogen und ggf. in kleine Stücke zerschnitten. Das Material wurde anschließend mit 250 mg Seesand in einer rauen Reibschale für $2\text{--}3 \text{ min}$ intensiv verrieben. Die Masse wurde mit Hilfe von 15 mL

Biosensor-Fließmittel pH 7,0 quantitativ in einen Messzylinder mit Normschliff überführt. Dieser wurde verschlossen unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Nach Ablauf von 30 min wurden 675 μL NaOH (5 M) zugegeben und der Zylinder wieder für 2 min verschlossen und geschüttelt. Im Folgenden wurde eine Lösung von KCl und KOH (0,1 M / 0,03 M) bis auf ein Volumen von 50 mL zugegeben. Nach Mischen wurde die Lösung durch eine mit Seesand bedeckte Fritte filtriert. Zylinder und Fritte wurden mit H_2O nachgewaschen und das Filtrat mit H_2O auf 100,0 mL aufgefüllt. Diese Lösung wird nachfolgend als Rohextrakt bezeichnet.

2.12 Cyanid-Quantifizierung - Standardmethode

2.12.1 König-Reaktion

Zur photometrischen Quantifizierung von Cyanid wurde ein an Mikrotiterplatten angepasstes Schema der König-Reaktion herangezogen, die bereits 1947 von Epstein [Eps47] zur Bestimmung von Cyanid verwendet und unter Austausch einiger Reagenzien über die Jahre zum Beispiel von Lundquist, Rosling und Sörbo verfeinert wurde [LRS85]. Der Ablauf der Reaktion ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Eine Mikrotiterplatte wurde nach dem Schema in Tabelle 2.7 vorbereitet. Die ersten drei Spalten (1–3) wurden von oben nach unten mit je 180 μL Standard bzw. Probe befüllt. Anschließend wurden mit einer Mehrkanalpipette je 50 μL KH_2PO_4 -Lösung 1,3 M in die Vertiefungen der Spalten 1–3 gegeben und durch dreifaches Hochziehen und Ablassen mit der Pipette gemischt. 130 μL des Inhalts von Spalte 1 wurden in Spalte 4 überführt und wie zuvor gemischt. Ebenso wurde mit Spalte 2 und 3 (Überführen in Spalte 5 bzw. 6) verfahren. Aus Spalte 4 (sowie 5 und 6) wurden nun 110 μL in Spalte 7 (bzw. 8 und 9) pipettiert und gemischt. Zuletzt wurde die Absorption der einzelnen Vertiefungen der Spalten 7–9 mit dem Mikrotiterplattenreader bei 580 nm gemessen, eine Kalibrationsgerade erstellt und die Konzentration der Proben berechnet. Die Konzentrationen der Standards betrugen zwischen 1 und 50 μM , die Proben wurden durch Verdünnen ebenfalls in diesen Konzentrationsbereich gebracht.

2.12.2 Isolierung von Cyanid aus Matrices

Die Isolierung von Cyanid aus komplexen Matrices, in vorliegenden Fall Pflanzenextrakten, wurde mit einer leichten Abänderung der Methode für leicht freisetzbare Cyanid nach DIN 38405 [din81] vorgenommen. Der schematische Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 2.7 wiedergegeben. Zusammengefasst wird ein Luftstrom nach

Tabelle 2.7: Pipettierschema für Cyanidbestimmung mittels König-Reaktion.

1–3		4–6	7–9
frei	6 μL Chloramin-T-Reagenz	15 μL Pyr / Barb-Reagenz	

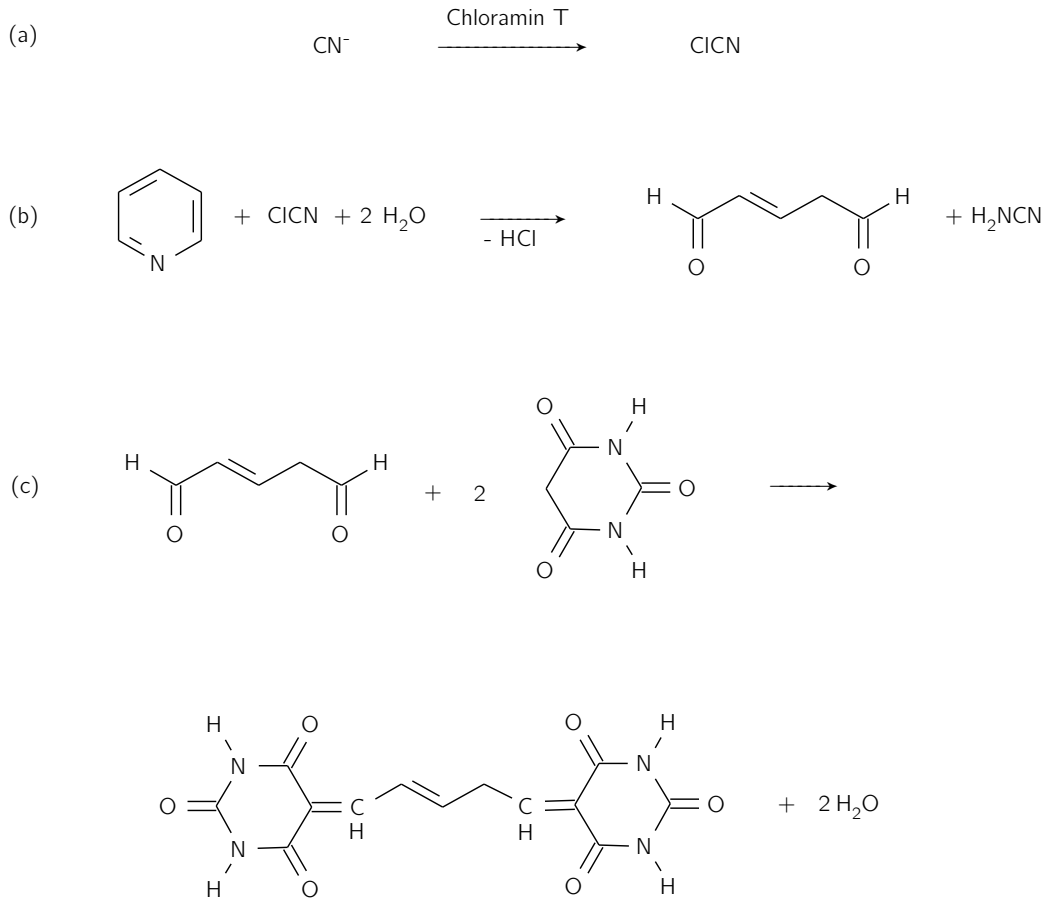
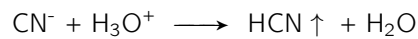
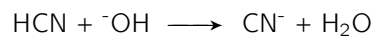


Abbildung 2.6: Reaktionsschema der König-Reaktion. (a) Bildung von Chlorcyan aus Cyanid, (b) Ringöffnung von Pyridin unter Einfluss von Chlorcyan, (c) Reaktion des entstandenen Diketons mit Barbitursäure zu einem Polymethin-Farbstoff.

Waschen mit Natronlauge durch eine angesäuerte Cyanid-Lösung geleitet. Durch Ansäuern wird Cyanid protoniert:



Blausäure, die protonierte Form, wird mit dem Luftstrom in eine alkalische Absorptionslösung [(d) in Abbildung 2.7] überführt. In dieser wird Blausäure wieder deprotoniert und somit in Lösung gehalten:



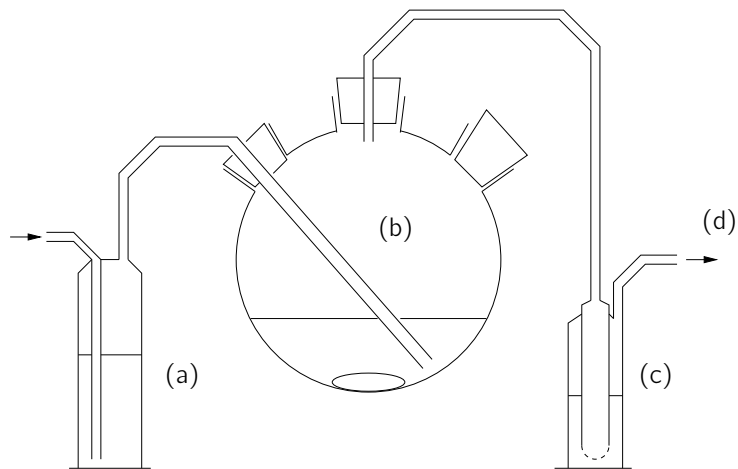


Abbildung 2.7: Aufbau nach DIN 38405. (a) Waschflasche mit Natronlauge, (b) Probenkolben, (c) Absorptionsgefäß mit Absorptionslösung, (d) zur Pumpe.

Nichtflüchtige Substanzen bleiben dabei im Probenkolben zurück, flüchtige Substanzen, die nicht durch Natronlauge zurückgehalten werden, werden komplett aus dem System entfernt. Im Folgenden wird die Vorgehensweise detailliert beschrieben.

Das Absorptionsgefäß [(c) in Abbildung 2.7] wurde mit 20 mL Natronlauge (1 M) befüllt. Im Anschluss wurde die Pumpe eingeschaltet und auf einen Luftdurchsatz von $60 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ eingestellt. 10 mL Zink- / Cadmiumsulfat-Lösung, 10 mL $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösung sowie 50 mL Phthalat-Lösung wurden in den Probenkolben [(b) in Abbildung 2.7] pipettiert.

100,0 mL Probelösung wurden mit 0,50 mL Natronlauge (5 M), 0,50 mL SnCl_2 -Lösung und 1,0 mL Zink- / Cadmiumsulfat-Lösung versetzt. 100,0 mL dieser Lösung wurden in den Probenkolben gegeben. Der pH-Wert der Lösung im Kolben wurde nun, kontrolliert durch eine pH-Elektrode, mit Natronlauge (1 M) auf 3,9 eingestellt. Schließlich wurden noch 300 mg Zinkpulver in den Probenkolben hinzugefügt.

Die Waschflasche [(a) in Abbildung 2.7] wurde mit 100 mL Natronlauge (1 M) befüllt. Nach 4 h Rühren der Lösung im Probenkolben mittels Rührfisch sowie einem Luftdurchfluss von $60 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ wurde die Lösung aus dem Absorptionsgefäß quantitativ in einen 100 mL Messkolben überführt und mit H_2O aufgefüllt. Diese Lösung wird nachfolgend „Absorptionslösung“ genannt.

Dieses Vorgehen unterscheidet sich von der DIN-Vorschrift in drei Punkten. Zum einen sieht die DIN-Vorschrift eine pH-Einstellung der Probelösung mit Hilfe von Phenolphthalein vor. Ist die Lösung ungefärbt (d. h. $\text{pH} \leq 8$), wird Natronlauge bis zur schwachen Färbung hinzugegeben. Ist die Lösung gefärbt (d. h. $\text{pH} \geq 8$), wird Salzsäure bis gerade zur Entfärbung zugefügt. Der letztere Fall führt allerdings zu einem pH-Wert von ca. 8, bei dem nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung das Verhält-

nis von Blausäure zu Cyanid schon größer als 10 ist (pK_S von Blausäure: 9,2). Mit dieser Vorgehensweise wurden Wiederfindungsraten von nur 20–60 % erreicht. Es ist zu vermuten, dass Blausäure schon vor Einbringen in das System entweicht. Da die Proben im Rahmen dieser Arbeit ohnehin genügend alkalisiert waren, wurde auf diese Einstellung des pH-Werts verzichtet.

Die zweite Änderung betraf die Verwendung eines Rührfisches. Dieser ist in der DIN-Vorschrift nicht vorgesehen. Zuletzt bleibt noch anzumerken, dass für die Absorptionslösung laut DIN ein Volumen von 10 mL vorgeschrieben ist. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit auf 20 mL erhöht, da keine genügend kleinen, als Absorptionsgefäß tauglichen Glasgeräte vorhanden waren.

2.13 Sensoraufbau

2.13.1 Enzymatischer Durchflusssensor

Der Aufbau des enzymatischen Durchflusssensors ähnelt stark dem der FIA-Apparatur, und im Grunde handelt es sich auch um einen FIA-Aufbau. Der Übersichtlichkeit halber wird in dieser Arbeit aber nur der Aufbau zur Ammoniakanalyse als FIA bezeichnet. Wie in Abbildung 2.8 zu sehen, durchfließt ein Hauptstrom Biosensor-Fließmittel pH 7,0 zunächst ein Injektionsventil mit einer Schleife von 300 μL und danach eine Cyanidase-Kartusche, in der Cyanid in Proben zu Ammoniak und Formiat hydrolysiert wird. Nun wird eine Lösung von NAD^+ in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 zum Hauptstrom zugemischt. Das entstehende Gemisch strömt dann durch eine FDH-Kartusche, in der Formiat zu Kohlendioxid oxidiert und NAD^+ zu NADH reduziert wird. Zuletzt wird in einer Flusszelle mit eingebautem Elektrodenchip das entstandene NADH amperometrisch detektiert.

Eine Schlauchpumpe mit einer Umdrehung von 20 rpm sorgte für den Transport der Flüssigkeiten. Der Pumpenschlauch für Biosensor-Fließmittel pH 7,0 besaß einen

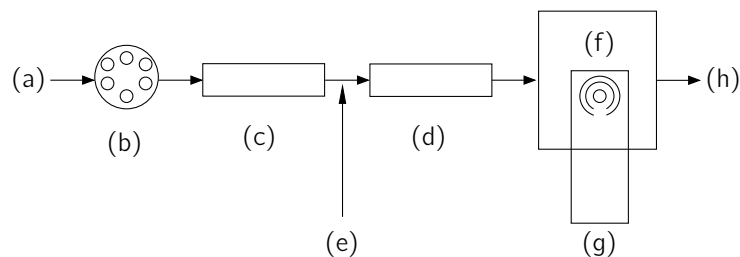


Abbildung 2.8: Aufbau des enzymatischen Durchflusssensors. (a) Biosensor-Fließmittel pH 7,0, (b) Injektionsventil (Schleife: 300 μL), (c) Cyanidase-Kartusche, (d) FDH-Kartusche, (e) NAD^+ -Zufluss, (f) Flusszelle, (g) Elektrodenchip, (h) Abfall.

ID von 0,51 mm, während für NAD^+ -Lösung ein Schlauch mit einem ID von 0,38 mm verwendet wurde. Aufgrund von Schwankungen des Anpressdrucks in der Kassette der Schlauchpumpe, Schwankungen des Widerstands der Kartuschen sowie Materialermüdung bei den Schläuchen waren die Flussraten bezogen auf verschiedene Tage nicht konstant. Biosensor-Fließmittel pH 7,0 besaß eine Rate zwischen $0,5\text{--}0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, während bei der NAD^+ -Lösung Flussraten zwischen $0,3\text{--}0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ beobachtet wurden.

Proben wurden analog zur FIA (Kapitel 2.6) mit Biosensor-Fließmittel pH 7,0 verdünnt (maximal 50 mL Probe pro L Fließmittel), in einem Probenröhrchen in ein Rack gestellt und gesteuert von der FIA-Software mit dem FIA-Probengeber in das Injektionsventil injiziert. Bei den Elektrodenchips handelte es sich um Chips der Firma BVT, daher wurde auch die Flusszelle derselben Firma eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.1).

2.13.2 Gassensor

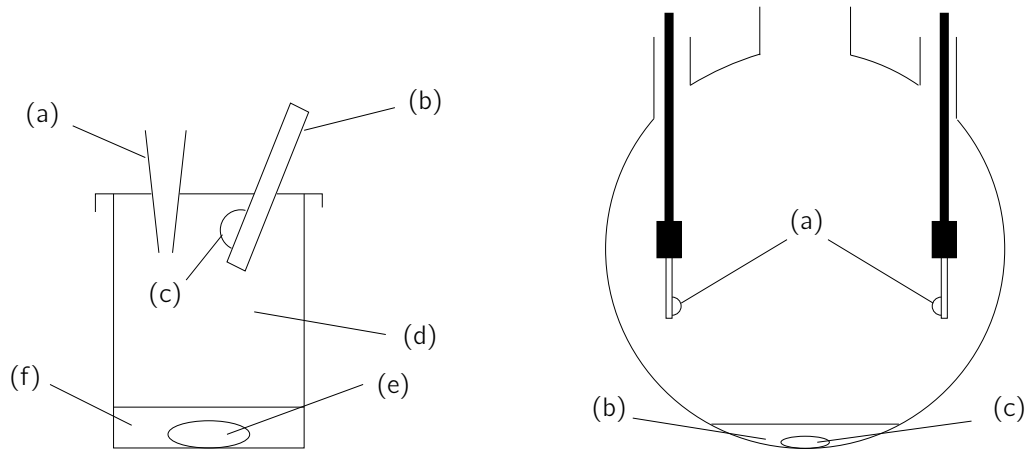
Messungen in der Gasphase wurden mit verschiedenen, in Abbildung 2.9 dargestellten Aufbauten durchgeführt. Allen Messaufbauten gemeinsam ist, dass ein Gefäß mit einem gewissen Volumen oder einer gewissen Masse an Säure oder einer sauren Mischung befüllt und mit einem Rührfisch versehen wurde. Ein Elektrodenchip wurde gleichmäßig über alle Elektroden mit einer Mischung bedeckt, indem ein definiertes Volumen der jeweiligen Mischung mit einer Pipette auf den Chip gegeben und mit der Pipettenspitze vorsichtig verteilt wurde (siehe hierzu Abbildung 3.45 auf Seite 116). Danach wurde der Chip im Gasraum platziert. Der Gasraum war während der Messungen gegenüber der umgebenden Raumluft luftdicht abgeschlossen. Proben wurden entweder per Hand zupipettiert, wobei der Gasraum für kurze Zeit geöffnet werden musste, oder mit einer an einen Dilutor angeschlossenen Probennadel, die durch ein Septum in den Gasraum ragte, zugegeben. Während mancher Messungen war das jeweilige Gefäß in ein temperiertes Wasserbad getaucht.

Die genauen Bedingungen wie Zusammensetzung und Volumina von Säure im Kolben und Mischung auf dem Chip, Typ des Elektrodenchips, angelegtes Potential etc. sind für jedes Experiment in Tabelle 3.14 zusammengestellt. Auf Besonderheiten wird zudem im Text eingegangen.

2.14 Chemische Modifizierung von Elektroden

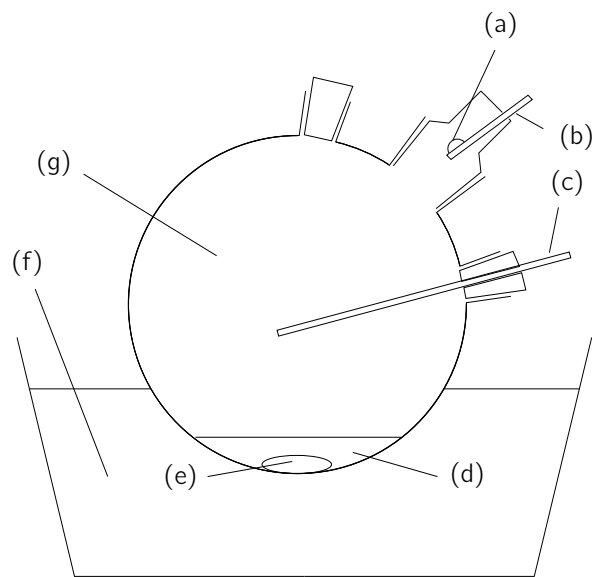
2.14.1 Aufbringen von Berliner Blau

In diversen Publikationen beschreiben Karyakin et al. [KGK95, KKG96, KKG98, KK99, KKG99] Variationen einer Methode zum Aufbringen einer Schicht PB auf Glaskohlenstoff-WE. Eine Version dieser Methoden wurde herangezogen, um in dieser Arbeit verwendete Elektroden mit PB zu bedecken. Hierzu wurde die zu bedeckende Elektrode in eine wässrige Lösung von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (2 mM), $\text{FeCl}_3 \times 6\text{ H}_2\text{O}$ (2 mM), KCl



A Rollrandglas. (a) Probenöffnung (während Messung mit Stopfen verschlossen), (b) Elektrodenchip, (c) Mischung (evtl. mit Enzymen), (d) Gasraum, (e) Rührfisch, (f) Säure.

B Zwei Elektrodenchips in Dreihalskolben (Öffnungen während Messung luftdicht verschlossen). (a) Mischung auf Elektrodenchip, einmal mit, einmal ohne Cyanidase, (b) Säure, (c) Rührfisch.



C Dreihalskolben. (a) Mischung (evtl. mit Enzymen), (b) Elektrodenchip, (c) Probenzugabe, (d) Säure, (e) Rührfisch, (f) Wasserbad, (g) Gasraum.

Abbildung 2.9: Aufbauten für Biosensormessungen in der Gasphase.

(0,1 M) und HCl (0,1 M) gehalten. Nach 100 s bei einem angelegten Potential von 0,4 V wurde die Elektrode aus der Lösung entnommen und mit H₂O gespült. Bei einem Potential von 0,4 V wird Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert und es bildet sich durch die in Kapitel 1.3.8 auf Seite 37 beschriebenen Reaktionen eine Schicht PB auf der Oberfläche der Elektrode. Danach wurde der Elektrode in einer Lösung von KCl (0,1 M) und HCl (0,1 M) bei einer Rate von 50 mV·s⁻¹ ein 15× zwischen -0,05 V und 0,35 V alternierendes Potential aufgezwungen, das laut den oben zitierten Artikeln von Karyakin et al. die Schicht auf nicht näher beschriebene Weise aktiviert. Nach dieser Prozedur wurde die Elektrode mit H₂O gespült und trocken und dunkel aufbewahrt.

2.14.2 Adsorption von Meldolablauf nach elektrochemischer Vorbehandlung

Die hier beschriebene Methode zur elektrochemischen Vorbehandlung basiert auf einer Veröffentlichung von Nagy, Kapui und Gorton [NKG95]. Aufgrund von Beschränkungen im Arbeitsbereich des verwendeten Potentiostaten (PalmSens) musste die obere Grenze des Potentials (+3,0 V gegen eine Kalomelelektrode) angepasst werden. Zudem erlaubte der PalmSens keine durchgängige Cyclisierung des Potentials bei 5 V·s⁻¹ über 120 s.

Die zu behandelnde Elektrode wurde in FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 getaucht, der zuvor 10 min mit Argon von Sauerstoff befreit worden war. Dann wurde ein bei 2 V·s⁻¹ zwischen -0,45 und +2,0 V alternierendes Potential angelegt. Da mit dem PalmSens lediglich fünf Cyclen automatisiert durchgeführt werden konnten, musste nach diesen fünf Cyclen etwa 5 s auf Bereitschaft des PalmSens gewartet werden, bis erneut fünf Cyclen gestartet werden konnten. Während der Wartephase wurde das Potential auf -0,5 V gehalten. Dies wurde über 2 min durchgeführt, danach wurde das Potential wieder für 60 s auf -0,5 V gehalten. Bei einer derartigen anodischen Behandlung des Elektrodenmaterials Graphit werden Kohlenstoffatome unspezifisch oxidiert und es entsteht so genanntes Graphitoxid. Dieses enthält Alkohol-, Phenol-, Epoxid-, Carbonyl- und Carboxylgruppen [BHDW91].

Nach Abspülen mit H₂O wurde der Chip ohne angelegtes Potential für 30 s in einer Lösung von MB in Wasser (5 mg·L⁻¹) geschwenkt. Der Chip wurde erneut abgespült und trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

2.15 Bestimmung der Henry-Konstanten von Blausäure

Die Bestimmung von Henry-Konstanten für verschiedene Bedingungen wurde mit einem einfachen Aufbau realisiert. Ein Rollrandglas (27,5 mL) wurde mit 950 µL Säure bzw. Säuremischung sowie einem Rührfisch befüllt. Sofort nach Zugabe von 50 µL Cyanid-Lösung (20 mM) wurde das Rollrandglas mit einem Deckel verschlossen. Nach 30 bzw. 60 min Rühren wurde das Gefäß geöffnet und unverzüglich 20 µL der Säure

in ein Reaktionsgefäß mit 850 μL Natronlauge gegeben. Die Cyanidkonzentration dieser Lösung wurde anschließend mittels Farbassay (Kapitel 2.12.1) bei entsprechender Kalibration bestimmt. Hieraus konnte über die Differenz der Stoffmenge des eingesetzten und des in Lösung verbliebenen Cyanids die Stoffmenge im Gasraum berechnet werden. Der Partialdruck von Blausäure im Gasraum wurde näherungsweise mit dieser Stoffmenge aus der allgemeinen Gasgleichung abgeleitet. Mit den so erhaltenen Werten konnten Henry-Konstanten für verschiedene Säuremischungen ermittelt werden.

2.16 Sicheres Arbeiten mit Cyanid

2.16.1 Einwiegen und Lösen

Da ein versehentlicher Säurespritzer in ein geöffnetes Vorratsgefäß für Kaliumcyanid verheerende Folgen hätte, wurde das Öffnen des Vorratsgefäßes sowie das Überführen von Kaliumcyanid auf bzw. in zuvor tarierte Behältnisse ausschließlich unter dem Abzug durchgeführt.

Es wurde streng darauf geachtet, dass nur bei absoluter Notwendigkeit mehr als 50 mg Kaliumcyanid gleichzeitig im Labor im Einsatz waren. Darüber hinaus wurden nur Flüssigkeiten mit einem $\text{pH} \geq 12$ als Lösungsmittel für Cyanid benutzt.

2.16.2 Entsorgung

Flüssige Cyanidabfälle (maximal $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ansonsten Verdünnung) wurden unter dem Abzug bei einem pH-Wert von anfangs ≥ 13 mit einem Tropfen gesättigter Kupfersulfat-Lösung als Katalysator versetzt. Danach wurden mindestens 10 mL stabilisierte Wasserstoffperoxid-Lösung ($\omega = 30\%$) pro L Abfall zugegeben, bis ein pH von 10,5 erreicht war. Sofern dazu 50 mL Wasserstoffperoxid nicht ausreichten, wurde verdünnte Salzsäure zugegeben. Bei diesem pH wurde die Mischung über Nacht unter dem Abzug stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurde der pH mit verdünnter Salzsäure und etwa 5 mL Wasserstoffperoxid auf 8,5 abgesenkt. Nach vier Stunden wurde die Lösung bei fließendem Wasser langsam im Waschbecken entsorgt. Dies wurde der Entsorgung über die wässrigen Abfälle vorgezogen, da eine Zugabe von Wasserstoffperoxid in die wässrigen Abfälle unter Umständen zu gefährlichen Reaktionen führen kann. Der Eintrag von Wasserstoffperoxid sowie Kupfersulfat in das Abwasser ist unter den obigen Bedingungen dagegen akzeptabel, da bei der gegebenen Verdünnung keine Gefährdung mehr existiert.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung und Charakterisierung von Cyanidase

3.1.1 Proteingehalt und Aktivität

Die in Kapitel 2.7 beschriebene Methode ermöglichte die Gewinnung von Cyanidase-Lösungen unterschiedlichen, jedoch meist hohen Proteingehalts. Bestimmt nach der Methode nach Lowry (Kapitel 2.8.1) wurde ein mittlerer Proteingehalt von $6,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ verteilt auf durchschnittlich 10 mL Lösung erhalten. Bezogen auf 1 L Medium entspricht dies einer Ausbeute von im Mittel 76 mg Cyanidase. Spitzenwert der Ausbeute waren 113 mg pro L Medium. Auf die Reinheit des Proteins wird in Kapitel 3.1.5 eingegangen.

Die Aktivität, gemessen nach der in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Methode in den ersten Tagen nach der Aufreinigung, betrug durchschnittlich $25,6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (entsprechend $427 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$) bzw. $4,6 \text{ U}$ (77 nkat) pro mg Cyanidase. Der rechnerische Unterschied, der sich ergibt, wenn die oben genannten Proteinmengen mit den hier aufgeführten Aktivitäten in Beziehung gesetzt werden, erklärt sich dadurch, dass Aktivitäten, die erst nach mehr als einer Woche nach der Aufreinigung gemessen wurden, keine Berücksichtigung für die hier genannten Werte fanden. Eine Veröffentlichung von Gamoh und Sawamoto [GS88] mit Bezug auf Ergebnisse von D'Amico et al. [DSRW83] legt eine Störung der Aktivitätsmessung mittels FIA durch Cyanid nahe, indem nicht nur Ammoniak, sondern auch Cyanid mit den FIA-Reagenzien ein fluoreszierendes Produkt ergeben könnte. Dies wurde durch ein Experiment ohne Cyanidase-Aktivität überprüft, bei dem mit einer Cyanidkonzentration von 10 mM keine Fluoreszenz gemessen wurde und eine Störung somit ausgeschlossen werden konnte.

3.1.2 Verifizierung der Methode zur Proteingehaltsbestimmung

Da Imidazol laut Molina et al. [MRBSM96] die Proteinbestimmung nach Lowry stört, die Cyanidase-Lösung aber auch nach der Verdünnung für den Assay nach Lowry je nach Verdünnungsgrad noch mehr oder weniger (meist 20 mM) Imidazol enthielt, wurde der Einfluss von Imidazol auf das Ergebnis des Lowry-Assays untersucht. Hierfür wurden Verdünnungen (1 auf 20) einer Cyanidase-Lösung mit unterschiedlichem Imidazol-Gehalt angesetzt und mittels Lowry-Assay vermessen. Wie von Molina [MRBSM96] vorgeschlagen, wurde die Absorption der Probe durch lineare Regression auf einen Imidazolgehalt von 0 zurückgerechnet (Abbildung 3.1). Es ergab sich hierdurch in der Cyanidase-Lösung ein Proteingehalt von $10,46 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, wohingegen bei

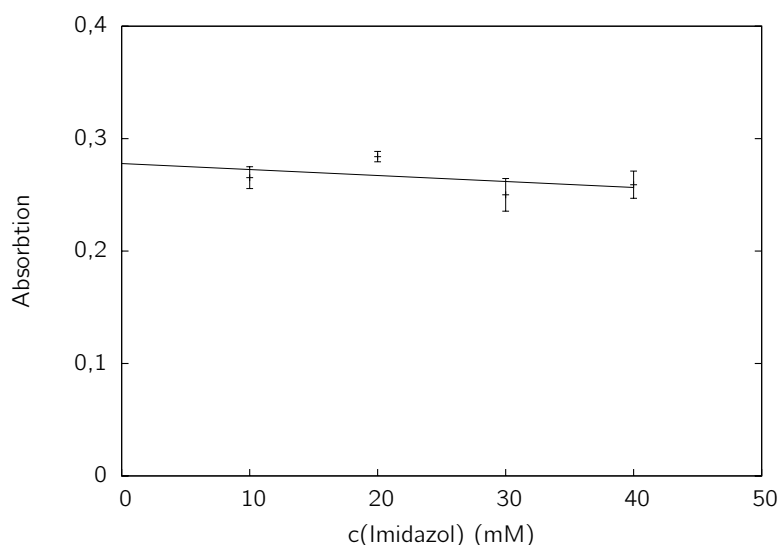


Abbildung 3.1: Proteingehalt nach Lowry bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen, mit eingezeichneter linearer Regression.

Nichtberücksichtigung des Imidazols ein Gehalt von $9,87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, also um 5,6 % zu wenig, gefunden worden wäre. Diese Abweichung erschien jedoch zu gering, um den hohen Aufwand der Imidazolkorrektur zu rechtfertigen, weshalb bei folgenden Proteingehaltsbestimmungen weiterhin nur eine mit H_2O verdünnte Cyanidase-Lösung als Probe verwendet und der durch Imidazol verursachte Fehler vernachlässigt wurde.

Des Weiteren wurde untersucht, ob BSA und Cyanidase in gleichem Maße nach Lowry reagieren, d. h. ob der direkte Bezug auf eine BSA-Kalibration für Cyanidase möglich ist. Dazu wurde der Proteingehalt von 5,0 mL einer Cyanidase-Lösung gravimetrisch nach der in Kapitel 2.8.2 dargestellten Methode bestimmt. Parallel dazu wurde der Proteingehalt der gleichen Lösung mit der Methode nach Lowry ermittelt. Der Lowry-Assay ergab mit $1,061 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ gegenüber dem Auswiegen ($1,175 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) einen um 9,7 % niedrigeren Wert.

3.1.3 Enzymkinetik

Enzymkinetische Parameter der benutzten Cyanidase wurden in zwei kurzen Versuchen mit unterschiedlichen Methoden (FIA bzw. Farbassay nach König) näherungsweise bestimmt.

Die Bestimmung mittels FIA wurde nach der in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die dort aufgeführte Cyanid-Lösung wurde in verschiedenen Verdünnungen (Endkonzentrationen in Lösung mit Enzym: 0,1, 0,5, 0,75, 1,0, 5,0 und 10,0 mM) eingesetzt; ansonsten wurden die Vorschriften der Methodenbeschreibung eingehalten. Es wurden pro Reaktionsgefäß 50 μL einer Cyanidase-Lösung mit einem

relativ niedrigen Proteingehalt von $0,87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ benutzt. In den Probenröhrchen mit 4 mL Lösung, in der die Reaktion stattfand, befand sich somit Cyanidase in einer Massenkonzentration von $10,9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Bei der Bestimmung enzymkinetischer Parameter mittels des in Kapitel 2.12.1 vorgestellten Farbbassays lief der von Cyanidase katalysierte Abbau von Cyanid zunächst in Lösung ab. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Teil dieser Lösung entnommen und in ein so genanntes Stoppgefäß überführt. Die darin enthaltene Natronlauge sorgte zum einen durch Denaturierung der Cyanidase für das sofortige Ende der Reaktion. Zum anderen hielt die Lauge das Cyanid in Lösung. Der Inhalt der Stoppgefäße wurde anschließend per Farbbassay vermessen.

Im Detail wurden 10 μL einer Cyanidase-Lösung mit einem Proteingehalt von $7,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 940 μL FIA-Fließmittel pH 7,0 versetzt und sofort nach Zugabe von 50 μL unterschiedlich verdünnter Cyanid-Lösungen gut gemischt. Gleichzeitig mit der Cyanidzugabe wurde eine Stoppuhr gestartet. Im Abstand von 30 bzw. 60 s (je nach Anfangskonzentration des Cyanids) wurden 3×10 bzw. 100 μL (wiederum abhängig von der anfänglichen Cyanidkonzentration) des Inhalts des Reaktionsgefäßes in ein Stoppgefäß, das 1990 μL NaOH 30 mM enthielt, überführt und gemischt. Der Inhalt der Stoppgefäße wurde wie in Kapitel 2.12.1 beschrieben vermessen, wobei zusätzlich Cyanidstandards mitgemessen wurden. Es wurden folgende Anfangskonzentrationen von Cyanid in den Reaktionsgefäßen verwendet: 0,10, 0,21, 0,42, 0,63, 0,83, 1,04, 2,09, 4,17, 6,26 und 10,43 mM. Die Massenkonzentration von Cyanidase in den Reaktionsgefäßen betrug $78,4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die Herstellung der Cyanidstandards erfolgte individuell für jede einzelne Cyanid-Anfangskonzentration, indem 50 μL der jeweiligen Cyanid-Lösung in ein Reaktionsgefäß mit 950 μL FIA-Fließmittel pH 7,0 gegeben wurden, so dass die gleiche Cyanidkonzentration wie zu Beginn der Reaktion im Gefäß mit Cyanidase entstand. Mit dieser Lösung wurden zusätzlich zwei Verdünnungen (6 auf 10 und 2 auf 10) mit FIA-Fließmittel pH 7,0 angesetzt. Pro Lösung wurde die gleiche Menge, die auch jeweils aus dem Reaktionsgefäß mit Cyanidase entnommen worden war, in ein Stoppgefäß überführt.

Die Michaelis-Menten-Diagramme finden sich in den Abbildungen 3.2 und 3.4. Die Parameter K_M und v_{\max} wurden durch Linearisierung nach Eadie-Hofstee (Abbildungen 3.3 sowie 3.5) berechnet und sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Ebenso enthält die Tabelle die Wechselzahl (k_{cat}), die durch Multiplizieren von v_{\max} mit der molaren Masse des Enzyms erhalten wurde.

Tabelle 3.1: Enzymkinetische Parameter

Methode	K_M (mM)	v_{\max} (nkat·mg ⁻¹)	k_{cat} (kat·mol ⁻¹)
FIA	1,93	268,2	10,47
Farbbassay	0,33	132,2	5,16

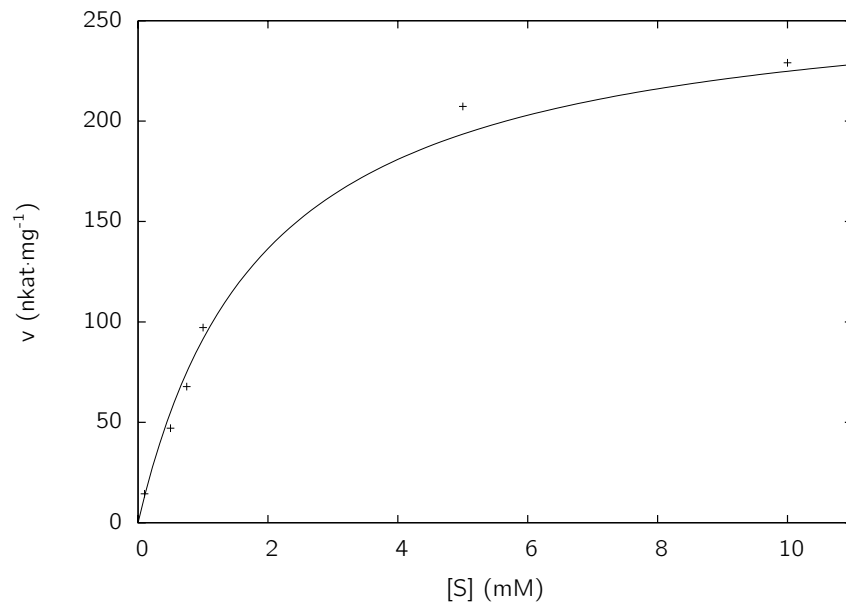


Abbildung 3.2: Michaelis-Menten-Diagramm, Kinetik mittels FIA.

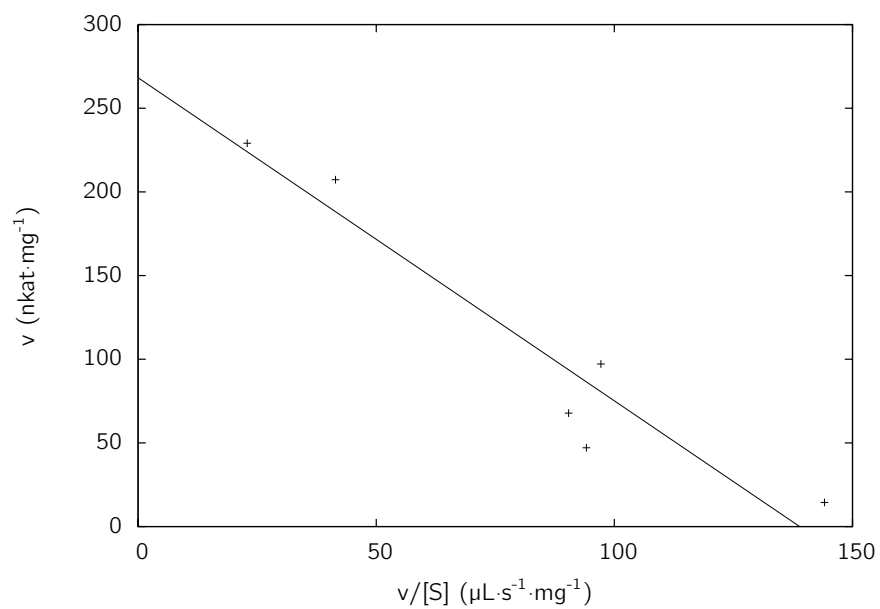


Abbildung 3.3: Linearisierung nach Eadie-Hofstee, Kinetik mittels FIA.

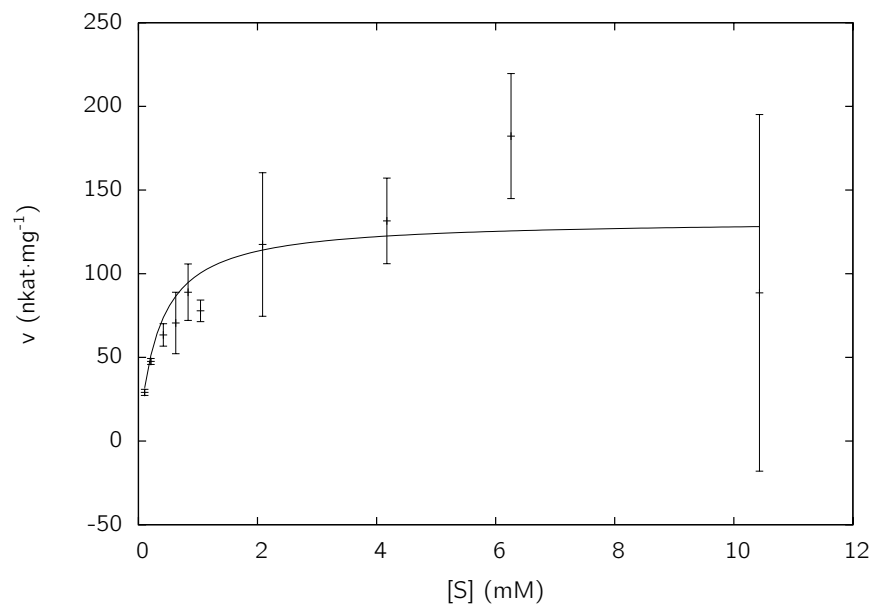


Abbildung 3.4: Michaelis-Menten-Diagramm, Kinetik mittels Farbassay.

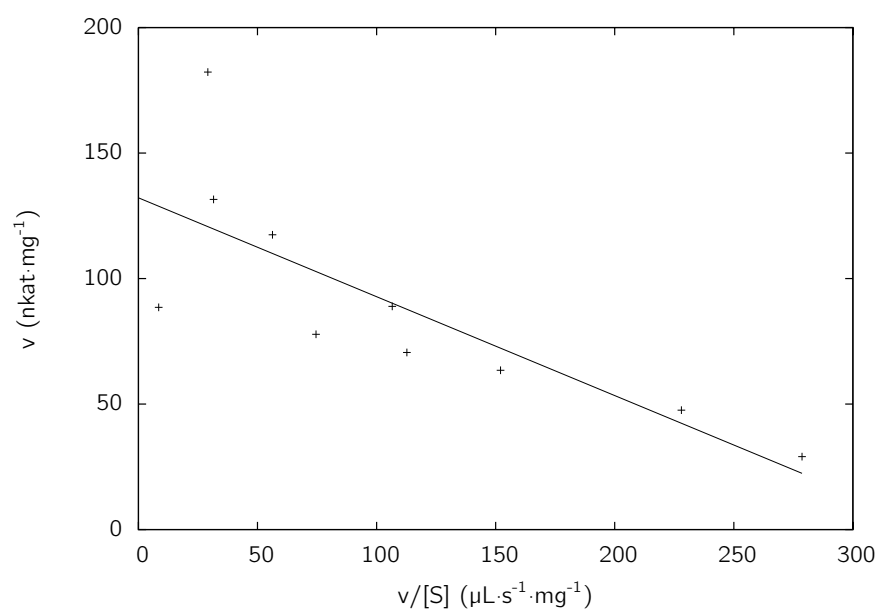


Abbildung 3.5: Linearisierung nach Eadie-Hofstee, Kinetik mittels Farbassay.

3.1.4 Stabilität

Die Aktivität einer in FPLC-Lösepuffer pH 7,0 belassenen und im Kühlschrank (KS, 4°C) gelagerten Cyanidase-Lösung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit der in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Methode gemessen. Zur Bestimmung der Reaktionsordnung des Abfalls der Aktivität wurden die Daten entsprechend 0., 1. und 2. Ordnung linearisiert. Bei der tatsächlich vorhandenen Ordnung sollten sich die Werte auf einer Geraden einfinden. Dies war der Fall für eine Kinetik 1. Ordnung (Auftragung des natürlichen Logarithmus des Aktivitätswerts gegen die Zeit). Die ursprünglichen Werte sowie die Linearisierung nach 1. Ordnung sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Es ergab sich folgende Ausgleichsgerade (linearisierte Werte):

$$f(x) = 3,217 - 0,01992 \cdot x$$

die für die ursprünglichen Werte zu

$$g(x) = 24,94 \cdot e^{-0,01992 \cdot x}$$

wird. Da für die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) bei

$$g(x) = A \cdot e^{B \cdot x}$$

gilt

$$T_{1/2} = -\frac{\ln(2)}{B}$$

konnte hiermit die Halbwertszeit berechnet werden. Es ergab sich ein Wert von 34,8 Tagen.

Um die Halbwertszeit zu vergrößern und somit die Stabilität des Enzyms zu verbessern, wurden verschiedene Lagerzusätze und Lagerbedingungen verglichen. Die in Tabelle 3.2 aufgeführten Einwaagen wurden jeweils mit der gleichen Cyanidase-Lösung auf 0,6 mL aufgefüllt. Jede der hier aufgeführten Lösungen wurde doppelt hergestellt. Eine der Lösungen wurde im KS, die andere im Gefrierschrank (GS, -18°C) gelagert.

Tabelle 3.2: Zusätze zu Cyanidase-Lösungen für Lagerversuch. Jeweils mit gleicher Cyanidase-Lösung auf 0,6 mL aufgefüllt.

Kurzform	Zusatz	Konzentration	
Azid	Natriumazid	0,8 mg	1,33 mg·mL ⁻¹
Ectoin	Ectoin	42,66 mg	0,5 M
	Hydroxyectoin	47,46 mg	0,5 M
Ectoin/Azid	Ectoin	42,66 mg	0,5 M
	Hydroxyectoin	47,46 mg	0,5 M
	Natriumazid	0,8 mg	1,33 mg·mL ⁻¹
Saccharose	Saccharose	205,4 mg	1 M

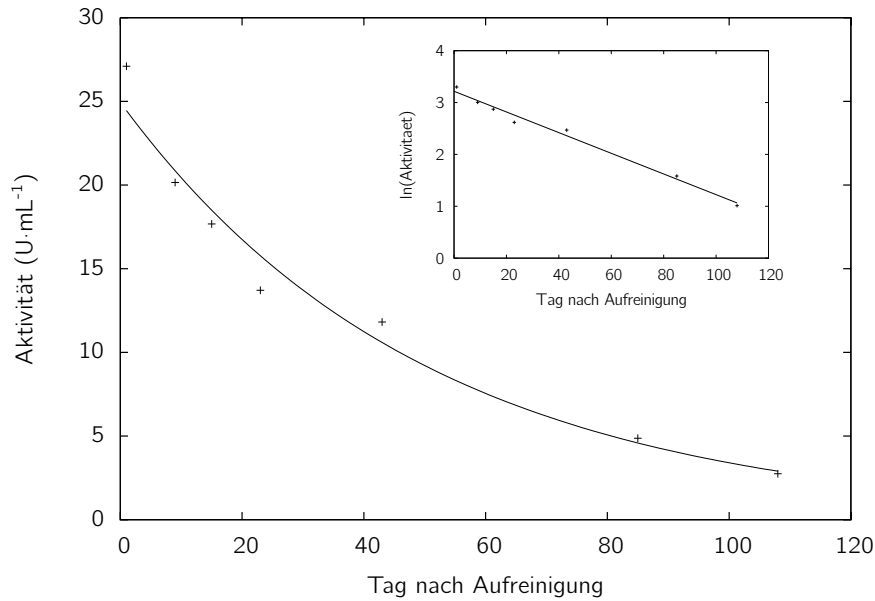


Abbildung 3.6: Entwicklung der Aktivität einer im KS gelagerten Cyanidase-Lösung.

Zudem wurde Cyanidase-Lösung durch einem sterilen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm) in autoklavierte 1,5 mL Reaktionsgefäße filtriert und ebenfalls teils im KS, teils im GS gelagert.

Die Aktivität der unbehandelten Cyanidase-Lösung wurde zwei sowie 93 Tage nach der Aufreinigung bestimmt. Die Aktivitäten der Enzymlösungen mit Lagerzusätzen bzw. nach Sterilfiltration wurden 16 sowie 93 Tage nach der Aufreinigung gemessen. Sämtliche Aktivitätsmessungen erfolgten per FIA (Kapitel 2.8.3). Mit Ausnahme der sterilfiltrierten wurde zudem der Proteingehalt jeder Lösung mit der Methode nach Lowry (Kapitel 2.8.1) ermittelt und die Aktivitäten auf den Proteingehalt der jeweiligen Lösung bezogen. Bei den sterilfiltrierten Lösungen wurde der Proteingehalt der ursprünglichen Cyanidase-Lösung für die Berechnung herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

Da im GS gelagerte Lösungen in diesem Versuch selbst nach 93 Tagen kaum eine Abnahme der Aktivität zeigten, war geplant, alle Cyanidase-Lösungen im GS zu lagern. Es zeigte sich allerdings, dass bei nahezu allen nachfolgend hergestellten Cyanidase-Lösungen nach Einfrieren und Auftauen sämtliches Protein ausgefallen und keine Aktivität mehr vorhanden war. Diese Lösungen waren mit der gleichen Methode hergestellt und aufgereinigt worden wie die für den oben beschriebenen Lagerversuch verwendeten Lösungen. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten konnte nicht gefunden werden.

Eine der wenigen Cyanidase-Lösungen, die ohne erkennbare Beeinträchtigung im GS gelagert werden konnte, wurde über 152 Tage wiederholt auf Aktivität überprüft.

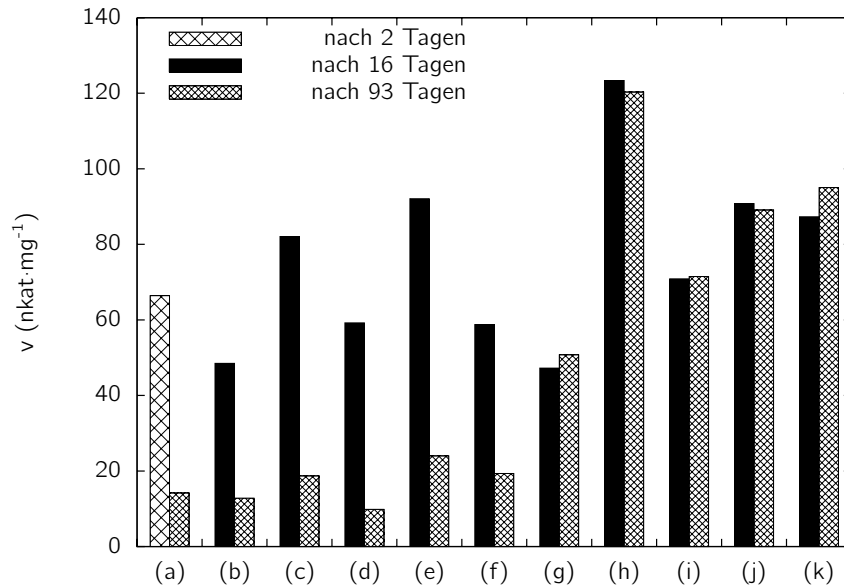


Abbildung 3.7: Entwicklung der Aktivität verschieden gelagerter Cyanidase-Lösungen entweder im KS oder im GS. (a) KS unbehandelte Lösung, (b) KS steril, (c) KS Azid, (d) KS Ectoin, (e) KS Ectoin/Azid, (f) KS Saccharose, (g) GS steril, (h) GS Azid, (i) GS Ectoin, (j) GS Ectoin/Azid, (k) GS Saccharose.

Dabei stellte sich eine Abnahme der Aktivität mit einer Halbwertszeit von 87 Tagen und somit eine deutlich stärkere Abnahme als beim vorherigen Lagerversuch heraus. Allerdings war diese Lösung weder mit Zusätzen versetzt noch sterilfiltriert worden.

Da die Lagerung im GS bis auf wenige Ausnahmefälle nicht möglich war, wurden Cyanidase-Lösungen in der Folge im KS gelagert. Auf Zusätze wurde dabei verzichtet. Zwar war beispielsweise bei Zugabe von Natriumazid eine Erhöhung der Aktivität beobachtet worden, jedoch erschien der Nutzen im Vergleich zu erwarteten Nachteilen wie Einflussnahme von Zusätzen auf Immobilisierungen oder elektrochemische Vorgänge zu gering.

3.1.5 Reinheit

Die Qualität der Cyanidase-Aufreinigung wurde in der Arbeitsgruppe mit Natriumdocylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Die Vorgehensweise ist in [Vog08] beschrieben. Beispiele solcher Gele sind in Abbildung 3.8 zu finden.

Mittels SDS-PAGE wurde auch überprüft, ob die Abnahme der Aktivität der Cyanidase durch einen Abbauprozess verursacht wurde. Denkbar wäre ein Vorhandensein geringer Mengen Protease aus *E. coli* oder auch mikrobielle Verunreinigungen. In die-

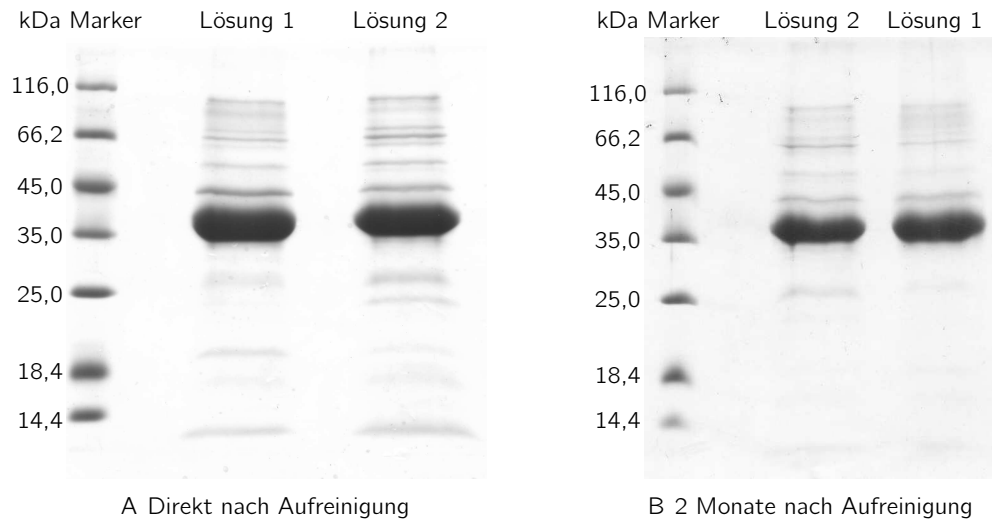


Abbildung 3.8: SDS-PAGE zweier Cyanidase-Lösungen zu verschiedenen Zeitpunkten.

sem Fall sollte die Hauptbande bei ca. 39 kDa schwächer werden und mindestens eine neue Bande auftauchen. Wie Abbildung 3.8B zeigt, wurden jedoch zwei Monate nach der Aufreinigung, in der die Aktivitäten der beteiligten Cyanidase-Lösungen schon auf 33 bzw. 40 % im Bezug zur Anfangsaktivität gefallen waren, keine Veränderungen in der Bandenstruktur beobachtet.

3.2 Aktivität der Formiatdehydrogenase

Die Aktivität der FDH wurde etwa 9 und 18 Monate nach Lieferung mit der Methode aus Kapitel 2.9 überprüft. Die Aktivitäten, berechnet sowohl mittels einer NADH-Kalibration als auch dem von JFC benutzten molaren Absorptionskoeffizienten, sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

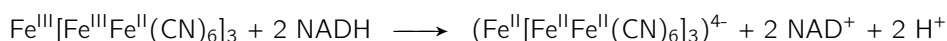
Tabelle 3.3: Aktivität der FDH

Alter (Monate)	Kalibration		Absorptionskoeffizient	
	U·mL ⁻¹	nkat·mL ⁻¹	U·mL ⁻¹	nkat·mL ⁻¹
9	279	4645	209	3479
18	240	3998	219	3657

3.3 Durchflusssensor mit direkter Formiatdetektion

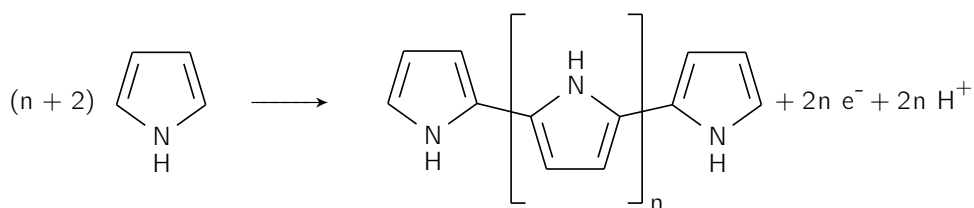
3.3.1 Pt-Elektrode, modifiziert mit Berliner Blau und Polypyrrol

Ein von Zhao et al. [ZYAW02] beschriebener Biosensor zur Bestimmung von Formiat sollte reproduziert und durch den Einsatz von Cyanidase auf die Bestimmung von Cyanid erweitert werden. Das Funktionsprinzip des Sensors besteht laut Zhao et al. darin, dass Formiat durch FDH zu CO_2 oxidiert und NAD^+ zu NADH reduziert wird. Das entstandene NADH wird dann durch PB als Mediator wieder oxidiert:



PB wird dabei zu Berliner Weiß reduziert. Das amperometrische Signal wird durch elektrochemische Reoxidation von Berliner Weiß zu PB erhalten.

Hierzu wurde die Pt-WE eines Elektrodenchips vom Typ W2 zunächst mit einer Schicht PB bedeckt. In dem Artikel werden nur ungefähre Angaben zur Vorgehensweise beim Aufbringen von PB gemacht. Deshalb wurde die in Kapitel 2.14.1 beschriebene Methode angewendet. Anschließend wurde die Elektrode in ein Gemisch von 3,56 mg NAD^+ , 21 μL Pyrrol, 27 μL FDH-Lösung und 950 μL Biosensor-Fließmittel pH 7,0 getaucht und 100 s galvanostatisch bei 1,57 μA gehalten. Pyrrol wird unter diesen Bedingungen elektrochemisch unter Oxidation zu Polypyrrol (PPY) polymerisiert:



Auf der Elektrode sollte sich eine Schicht von PPY unter Einschluss von NAD^+ und FDH bilden. Der schematische Aufbau der so erhaltenen Elektrode ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

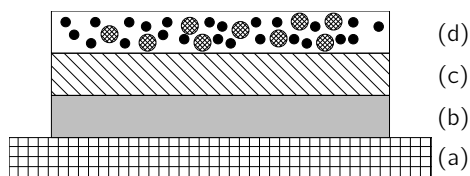


Abbildung 3.9: Schema Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB sowie NAD^+ und FDH in PPY. (a) Inertes Keramiksubstrat des Chips, (b) Elektrodenmaterial (Pt), (c) PB, (d) PPY mit eingeschlossener FDH (⊗) und NAD^+ (●).

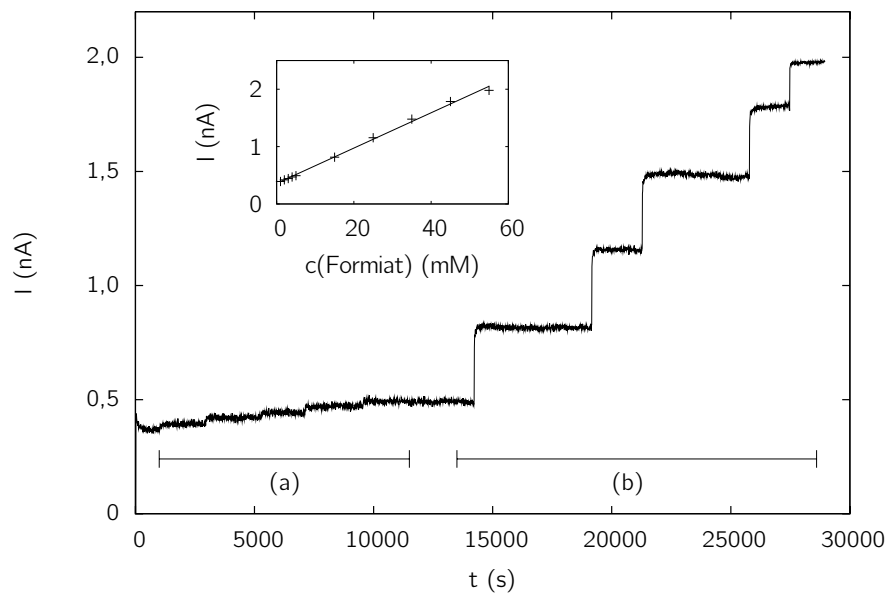


Abbildung 3.10: Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB sowie NAD^+ und FDH in PPY, Potential 0,3 V. Je $5\times$ Erhöhung der Formiatkonzentration um (a) ca. 1 mM bzw. (b) ca. 10 mM.

Nach dieser Prozedur wurde die Elektrode mit Biosensor-Fließmittel pH 7,0 abgespült und in 10,0 mL Biosensor-Fließmittel pH 7,0 getaucht. Nach Einschalten eines Rührers wurde über Nacht ein Potential von 0,3 V angelegt. Am nächsten Tag wurde die Reaktion des Sensors amperometrisch bei 0,3 V auf wiederholte Zugaben von Formiat gemessen, welche die Konzentration von Formiat um ca. 1 mM bzw. 10 mM erhöhten (Abbildung 3.10). Es zeigte sich ein deutliches, lineares Ansprechen des Sensors auf Formiatzugaben.

Um zu überprüfen, ob der Sensor tatsächlich nach dem von Zhao postulierten Prinzip arbeitet, wurde eine neue Elektrode nach der oben beschriebenen Methode modifiziert und unter gleichen Bedingungen vermessen, wobei allerdings keine FDH in die Mischung mit Pyrrol gegeben wurde. Das Funktionsprinzip sollte dadurch unterbrochen sein, und der Sensor nicht auf Formiatzugaben reagieren. Wie die in Abbildung 3.11 wiedergegebene Messung zeigt, wurde dennoch ein Signal bei Formiatzugaben beobachtet, das im Vergleich zum Sensor mit FDH sogar etwas stärker ausgeprägt war.

Bei dieser Messung wurden zusätzliche Untersuchungen unternommen. So wurde die KCl-Konzentration (ursprünglich 100 mM) in der Lösung um 1 mM und $2\times$ um 10 mM erhöht, um das Verhalten des Sensors bezüglich Änderungen der Ionenstärke und der Chloridkonzentration zu überprüfen. Das Signal erniedrigte sich leicht bei den Erhöhungen um 10 mM, wohingegen die Erhöhung um 1 mM keine Auswirkung zeigte. Acetat und Essigsäure nehmen Einfluss auf den pH-Wert und stellen bezogen

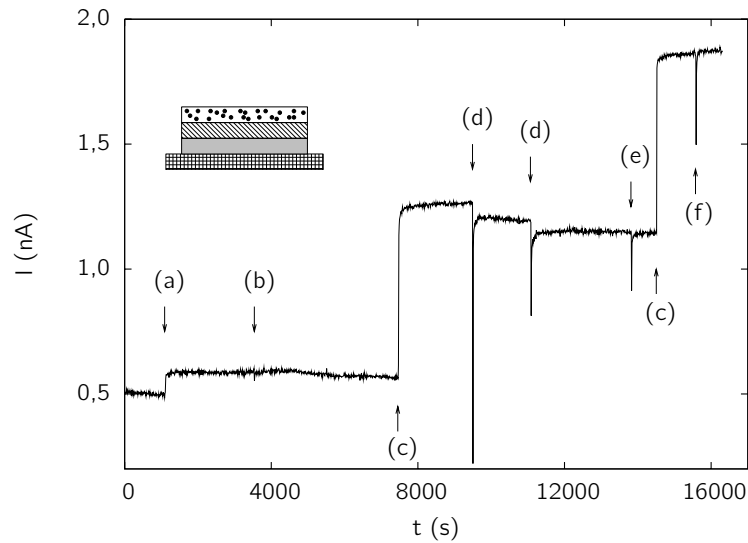


Abbildung 3.11: Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB sowie NAD^+ in PPY (ohne FDH), Potential 0,3 V. Zugaben mit Endkonzentrationen: (a) Formiat 1 mM, (b) KCl 1 mM, (c) Formiat 10 mM, (d) KCl 10 mM, (e) Acetat 4 mM, (f) Essigsäure 1 mM. Schema der Elektrodenbeschichtung analog zu Abbildung 3.9.

auf Formiat die nächsthöheren Vertreter in der homologen Reihe der Carbonsäuren dar. Auf diese Stoffe erfolgte keine Sensorantwort.

Es wurden nun mehrere Messungen mit frisch chemisch modifizierten Elektrodenchips in verschiedenen Modifikationsstufen durchgeführt, indem das in Kapitel 2.14.1 beschriebene Protokoll an verschiedenen Punkten abgebrochen wurde. Schließlich wurde auch ein unmodifizierter Chip vermessen. Dabei wurde jeweils die Reaktion des Chips auf Zugaben von Formiat sowie teilweise auf Cyanid untersucht. Die Sensogramme finden sich in den Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14. In allen Modifikationsstufen und auch ohne Modifizierung war ein Ansprechen auf Formiat zu erkennen. Cyanid zeigte, obwohl im Vergleich zu Formiat niedriger konzentriert, bei der jeweils ersten Zugabe ein wesentlich höheres Signal (Abbildung 3.12 und 3.14). Dieses äußerte sich aber nicht als konstante Stufe, sondern als Peak. Bei nachfolgenden Cyanidzugaben trat kein Peak mehr auf, vielmehr wurde ein Abfall des Stroms auf eine niedrigere Stufe beobachtet (Abbildung 3.14).

Die Reaktion auf Cyanid kann dadurch erklärt werden, dass an der Pt-Elektrode als elektrochemischer Halbzelle ein Gleichgewicht zwischen elementarem und ionisiertem Platin vorliegt. Cyanid entzieht diesem Gleichgewicht ionisiertes Platin durch Bildung von schwer löslichem Platincyano, was zum einen dazu führt, dass Pt nach der Nernst-Gleichung aus der elementaren Form zur erneuten Einstellung des Gleichgewichts ionisiert wird. Die hierbei freigesetzten Elektronen werden als Stromfluss gemessen,

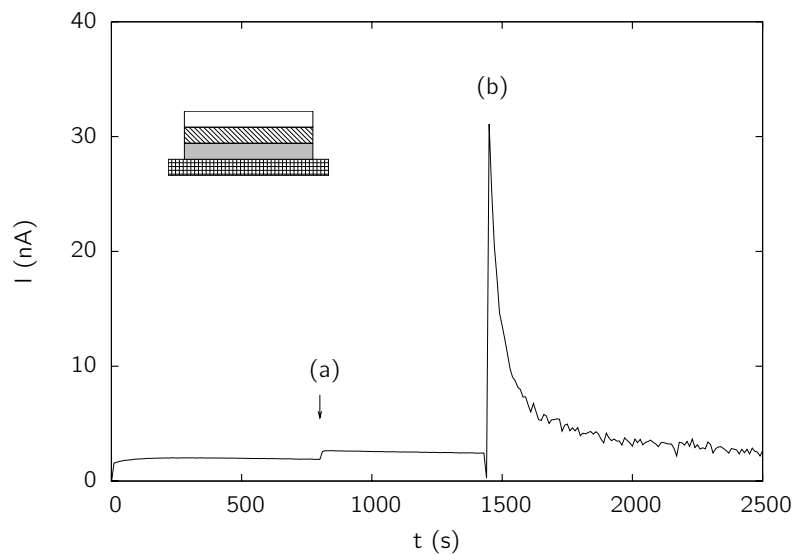


Abbildung 3.12: Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB und PPY (ohne FDH und NAD^+), Potential 0,3 V. Zugaben mit Endkonzentrationen: (a) Formiat 10 mM, (b) Cyanid 5 mM. Schema der Elektrodenbeschichtung analog zu Abbildung 3.9.

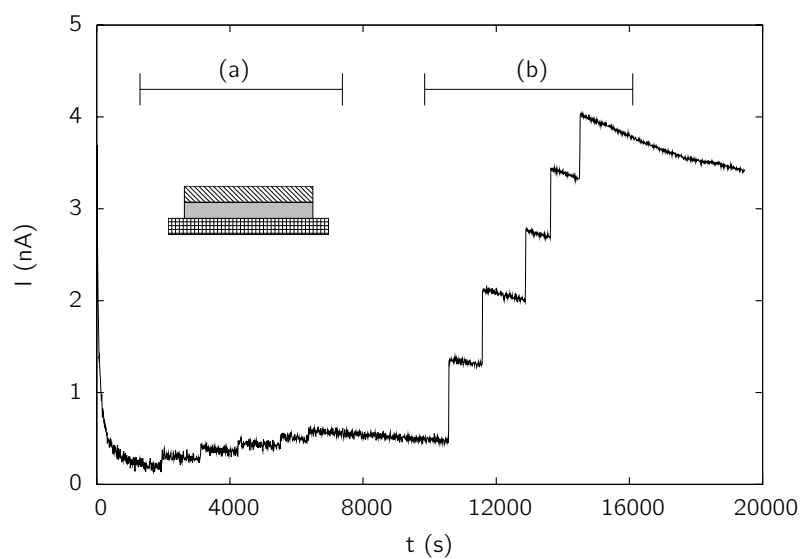


Abbildung 3.13: Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB (ohne PPY, FDH und NAD^+), Potential 0,3 V. Zugaben: (a) 5× Formiat (Erhöhung um je 1 mM), (b) 5× Formiat (Erhöhung um je 10 mM). Schema der Elektrodenbeschichtung analog zu Abbildung 3.9.

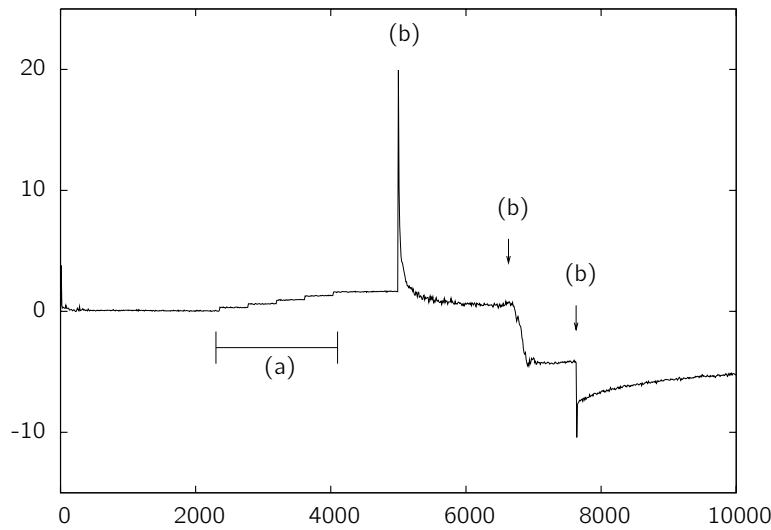


Abbildung 3.14: Unbehandelte Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. Zugaben: (a) 5× Formiat (Erhöhung um je 10 mM), (b) Cyanid (Erhöhung um ca. 3,6 mM).

der allerdings wieder abfällt, wenn die Reaktion zu Platincyanoxyd abgeschlossen ist. Zum anderen lagert sich schwer lösliches Platincyanoxyd auf der Elektrodenoberfläche ab. Dadurch wird die Oberfläche der WE passiviert. In der Folge führen erneute Zugaben von Cyanid zu keinem Signal, sondern nur zu weiterer Passivierung der Elektrode. Dies ist ein weiteres Beispiel für das in Kapitel 1.2.4 im Bezug auf NADH besprochene *electrode fouling*.

Die beschriebenen Vorgänge treten an Pt-, aber nicht an Graphit-WE auf. Beispielsweise zeigt ein Elektrodenchip vom Typ W5 bei einem Potential von 0,3 V nach Cyanidzugabe keinen Peak, sondern lediglich eine Erhöhung des Basislinienrauschens. Allerdings reagiert Typ W5 bei diesem Potential auch nicht auf Formiatzugaben (Abbildung 3.15).

Um die direkte Detektion von Formiat mittels Pt-WE trotz Reaktion auf Cyanid nutzen zu können, wurden weitere Untersuchungen vorgenommen. Da in dem angestrebten Durchflusssystem das Cyanid zunächst eine Kartusche mit immobilisierter Cyanidase durchläuft und hier mit der in Kapitel 3.4.3 gezeigten Umsatzrate zum großen Teil, aber nicht vollständig abgebaut wird, wurde im Folgenden untersucht, inwiefern sich Restkonzentrationen von Cyanid in einer Formiatprobe auf Durchflussmessungen auswirken.

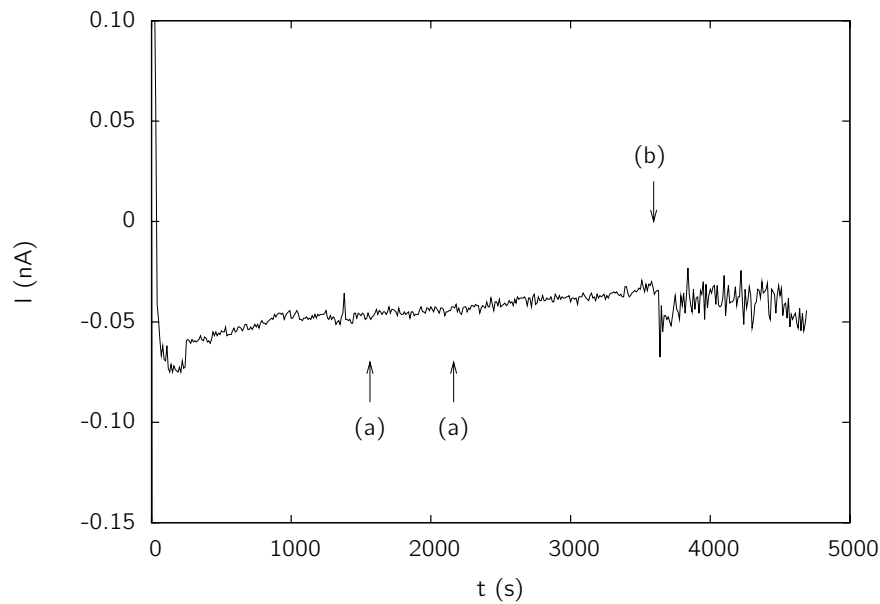


Abbildung 3.15: Messung in gerührter Flüssigkeit mit Elektrodentyp W5, Potential 0,3 V. Erhöhung der Konzentration von (a) Formiat um je 10 mM, (b) Cyanid um 4 mM.

3.3.2 Cyanidtoleranz

Zunächst wurde die optimale Flussrate eines Durchflusssystems bestehend aus einem Injektionsventil mit einer Schleife von 100 μL sowie einer Durchflussszelle mit Elektrodenchip ermittelt. Eine unmodifizierte Elektrode vom Typ W2 wurde bei 0,29 sowie 0,08 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ und einem Potential von 0,3 V amperometrisch vermessen. Als Fließmittel wurde Biosensor-Fließmittel pH 7,0 verwendet. Pro Flussrate wurden drei Formiatstandards in einer Konzentration von 10 mM (gelöst in Biosensor-Fließmittel pH 7,0) injiziert. Die Sensogramme (Abbildung 3.16) zeigen ausgeprägtere Peaks bei der niedrigeren Flussrate, so dass für die folgenden Versuche ein Fluss von 0,08 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet wurde.

Um eine Cyanidumsatzrate von ca. 99 % zu simulieren, wurden im Durchflusssystem des vorigen Versuchs mit einer frischen Elektrode vom Typ W2 Formiatproben in einer Konzentration von 10 mM mit Cyanid in einer Endkonzentration von 0,1 mM versetzt und dreifach bei 0,3 V vermessen. Anschließend wurden drei reine Formiatproben injiziert. Das Sensogramm (Abbildung 3.17) zeigt schon bei dieser geringen Menge einen deutlichen Einfluss des Cyanids auf das Signal. Somit kann ein Durchflusssensor allein mit vorgeschalteter Cyanidase-Kartusche, die in der Realität zudem eine wesentlich niedrigere Umsatzrate als 99 % besitzt (siehe Kapitel 3.4.3), nicht funktionieren.

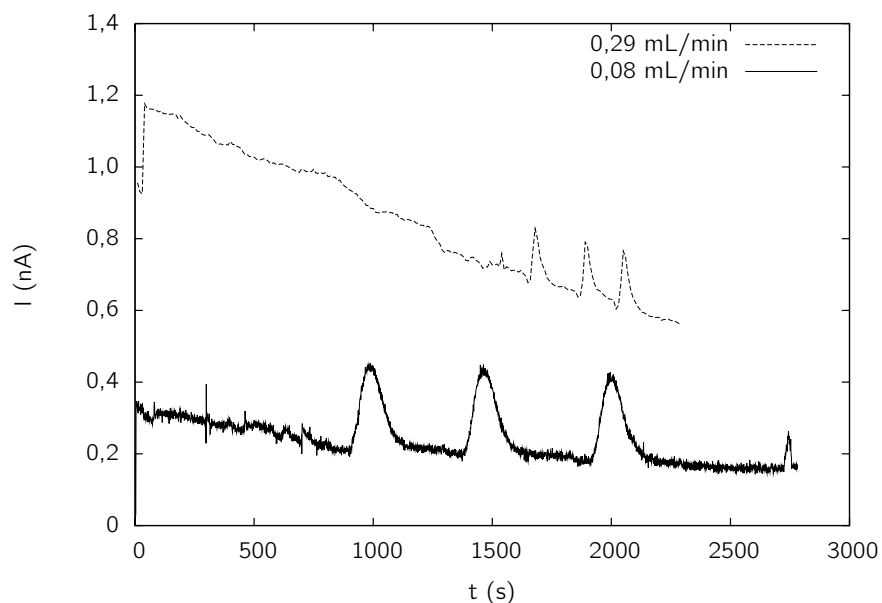


Abbildung 3.16: Durchfluss mit Pt-Elektrode (W2) bei verschiedenen Flussraten, Potential 0,3 V. Drei Injektionen von 100 μ L Formiatstandard (10 mM) je Messung.

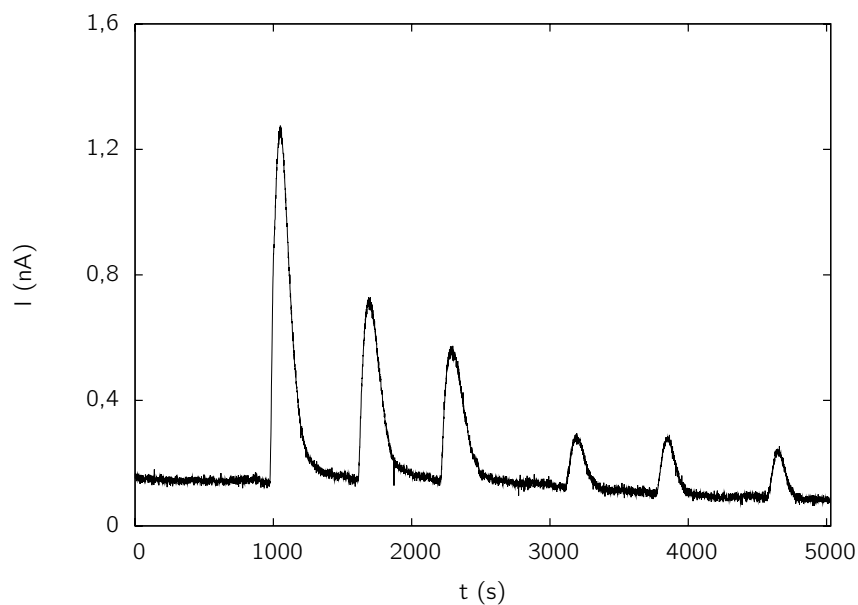
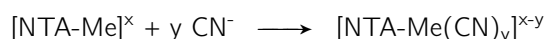


Abbildung 3.17: Durchfluss mit Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. Sechs Injektionen von 100 μ L Formiatstandard (10 mM) je Messung, die ersten drei davon mit 0,1 mM Cyanid versetzt.

3.3.3 Komplexieren des nicht hydrolysierten Cyanids

Als möglicher Ausweg bot sich an, das nach der Umsetzung durch Cyanidase nicht hydrolysierte Cyanid aus dem System zu entfernen. Da Cyanid mit vielen Metallionen sehr stabile Komplexe eingeht, wurde untersucht, ob eine Kartusche mit immobilisierten Metallionen (NTA-Me) Cyanid aus einer Formiatprobe entfernen kann:



Als Metallionen dienten Pd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Pt^{2+} . Die Auswahl erfolgte nach Stabilität des Cyanidokomplexes sowie Verfügbarkeit eines Salzes.

Laut Harrington et al. besitzt Tetracyanidopalladat ($[\text{Pd}(\text{CN})_4]^{2-}$) mit einem Wert für $\log \beta_4$ (siehe Erklärung unten) von 62,3 die höchste derzeit bekannte Komplexbildungskonstante überhaupt [HJH05]. Die Werte für die Komplexbildungskonstanten der Cyanidokomplexe von Ni^{2+} , Co^{2+} und Pt^{2+} wurden einer Zusammenstellung von Sillén und Martell entnommen [SM64] und sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Angegeben sind, wie auch schon zuvor, die kumulativen Komplexbildungskonstanten bzw. deren dekadische Logarithmen. So wäre bei einer Koordinationszahl von 4 die kumulative Komplexbildungskonstante für ein Metallion M und einen Ligand L wie folgt definiert:

$$\beta_4 = \frac{[\text{ML}_4]}{[\text{M}][\text{L}]^4}$$

Pt^{2+} , aus dem auch die WE bestand, besitzt eine deutlich höhere Konstante als Co^{2+} und Ni^{2+} . Sollten diese Ionen also durch Cyanid aus der Kartusche gelöst und als Cyanidokomplex bis zur WE gelangen, würde Cyanid aus dem jeweiligen Nickel- bzw. Kobaltkomplex in den Platinkomplex übergehen und so die Messung stören. Da die Möglichkeit bestand, dass Cyanid in der Kartusche festgehalten wird, wurden die beiden Ionen dennoch in Betracht gezogen.

Die Metallionen wurden auf je eine Kartusche vom Typ HiTrap™ Chelating HP (1 mL, Bindekapazität für Metallionen: 23 μmol) aufgebracht, indem Lösungen von Salzen mit den entsprechenden Metallionen durch die Kartuschen gepumpt wurden. Tabelle 3.5 gibt die Art des Salzes, die Konzentration und die aufgebrachte Stoffmenge an. Wie daraus abgelesen werden kann, wurden für Pd^{2+} und Pt^{2+} kleinere Stoffmengen verwendet. Beide Stoffe ließen sich in Wasser nur schwer in Lösung bringen.

Tabelle 3.4: Komplexbildungskonstanten einiger Cyanidokomplexe.

Metallion	Art der Konstanten	Wert
Ni^{2+}	$\log \beta_4$	11,7 - 31,0
Co^{2+}	$\log \beta_6$	19,1
Pt^{2+}	$\log \beta_4$	41,0
Pd^{2+}	$\log \beta_4$	62,3

Tabelle 3.5: Salze zur Herstellung von Metallion-Kartuschen

Salz	Konzentration (mM)	Stoffmenge (μmol)
$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	120	240
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	100	100
Cis-Platin	5	40
PdCl_2	10	67

PdCl_2 löste sich erst, als KCl bis auf eine Endkonzentration von 1 M zugegeben wurde (Bildung des Chloridokomplexes). Cis-Platin hat laut der GESTIS-Stoffdatenbank ([ges], abgerufen am 13.11.2009) bei 20°C eine Löslichkeit in Wasser von 2,5 g/L (8,3 mM). Dennoch gelang es auch nach langer Behandlung mit Ultraschall nicht, eine Lösung dieser Konzentration herzustellen. Da es sich bei allen anderen Salzen um farbige Lösungen handelte, konnte beobachtet werden, dass bereits nach Zugabe von etwa 30 μmol wieder farbige Lösung die Kartusche verließ. Daher wurde eine Auftragung von 40–70 μmol Pt^{2+} bzw. Pd^{2+} als ausreichend erachtet. Im Falle der braun gefärbten $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ -Lösung trat auch ungefähr die Hälfte der Lösung gefärbt aus der Kartusche aus. Zudem konnte die Bindung an die Kartusche durch eine Gelbfärbung verfolgt werden. Jede Kartusche wurde nach Aufbringen der Metallionen mit H_2O p. a. gespült.

Getestet wurden die Kartuschen durch Injizieren von Formiatstandard alleine sowie Formiat und Cyanid in gleicher Konzentration in ein Durchflusssystem bestehend aus Injektionsventil (Schleife 100 μL), der Kartusche selbst und einer Durchflussszelle mit einem Elektrodenchip vom Typ W2 bei 0,3 V (Abbildung 3.18). Bei erfolgreichem Abfangen des Cyanids durch die Metallionen in der Kartusche sollten alle Peaks gleiche Höhe und Fläche haben. Wie die Sensogramme in den Abbildungen 3.19, 3.20, 3.21 und 3.22 beweisen, war dies bei keinem Metallion der Fall. Co^{2+} , Ni^{2+} und auch Pt^{2+} zeigten wesentlich höhere Peaks bei mit Cyanid versetzten Formiatstandards als bei reinen Formiatstandards. Wie zuvor schon beobachtet, sank die Höhe der Cyanidpeaks

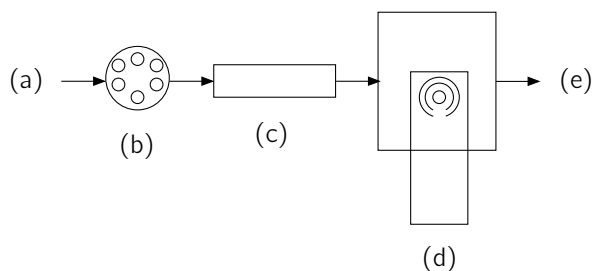


Abbildung 3.18: Schema des Versuchsaufbaus zu NTA-Kartuschen mit Metallionen.
 (a) Fließmittel, (b) Injektionsventil, (c) Kartusche mit Metallionen,
 (d) Flusszelle mit Elektrodenchip, (e) Abfall.

bei Wiederholung der Zugabe. Im Falle von Ni^{2+} ist sogar eine Art chromatographische Auftrennung von Formiat und Cyanid zu beobachten, was den Schluss zulässt, dass Ni-Ionen von der Kartusche abgelöst, aber durch das Kartuschenmaterial in der Wanderung verzögert werden. An der Elektrode schließlich kommt höchstwahrscheinlich die im Vergleich zu Ni^{2+} stärkere Affinität von Cyanid zu Pt^{2+} zum Tragen, was sich in dem hohen Stromfluss zeigt. Eine Kartusche mit Pd^{2+} war in der Lage, den durch Cyanid verursachten Peak fast komplett zu beseitigen. Dennoch waren die Peaks der mit Cyanid versetzten Standards höher als die der reinen Formiatstandards. Aufgrund der um über 20 Logarithmenstufen größeren Komplexbildungskonstanten von Pd^{2+} im Vergleich zu Pt^{2+} kann davon ausgegangen werden, dass die für Ni^{2+} und Co^{2+} vermuteten Vorgänge hier nicht stattfinden. Da aber die Silber-Silberchlorid-RE nach dem Versuch braun geworden war, wurde vermutet, dass auch Pd^{2+} von der Kartusche abgelöst wird und beim Zusammentreffen mit den Elektroden den Stromfluss beeinflusst. Somit wurde der Ansatz zur Entwicklung eines Durchflusssensors mittels direkter Formiatdetektion an Elektroden vom Typ W2 nicht weiter verfolgt.

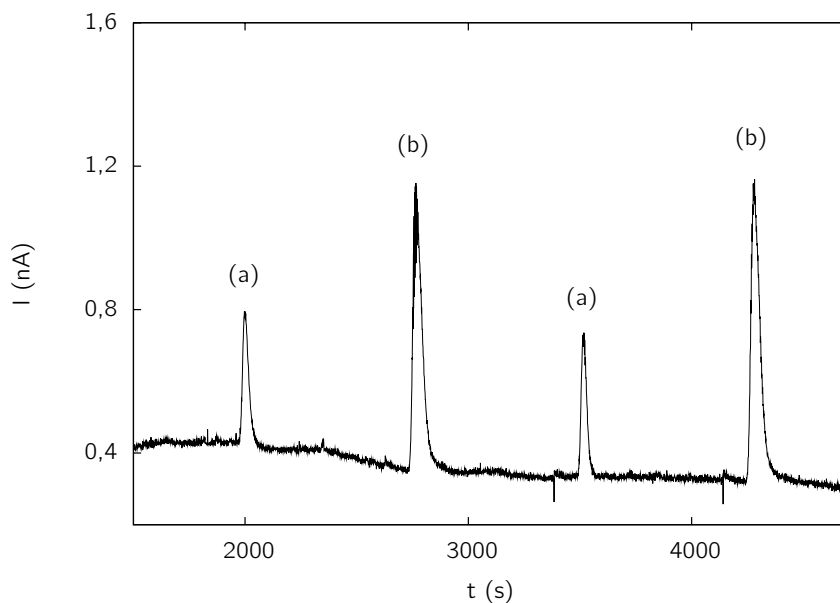


Abbildung 3.19: Pd^{2+} -Kartusche zum Abfangen von Cyanid, Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. (a) Formiat 10 mM, (b) Formiat und CN^- , beide 10 mM.

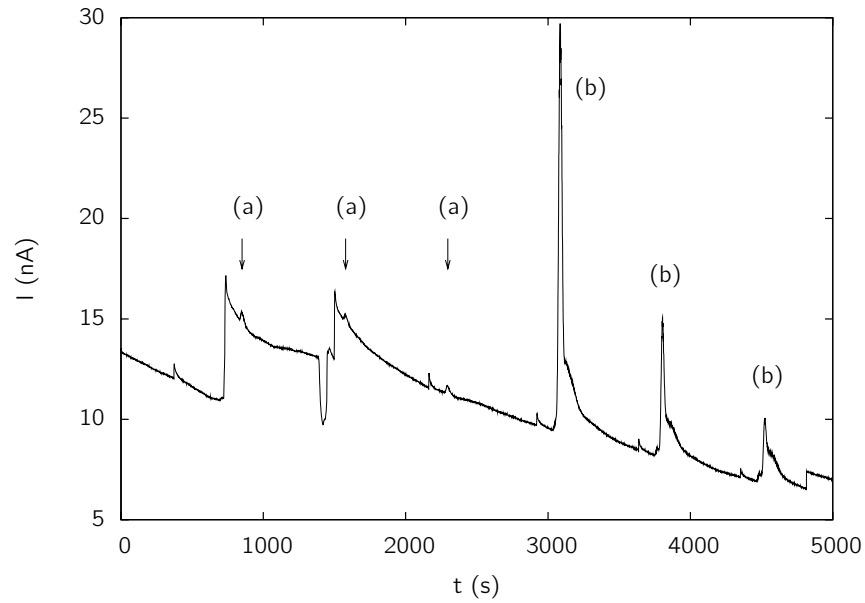


Abbildung 3.20: Co^{2+} -Kartusche zum Abfangen von Cyanid, Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. (a) Formiat 2 mM, (b) Formiat und CN^- , beide 2 mM.

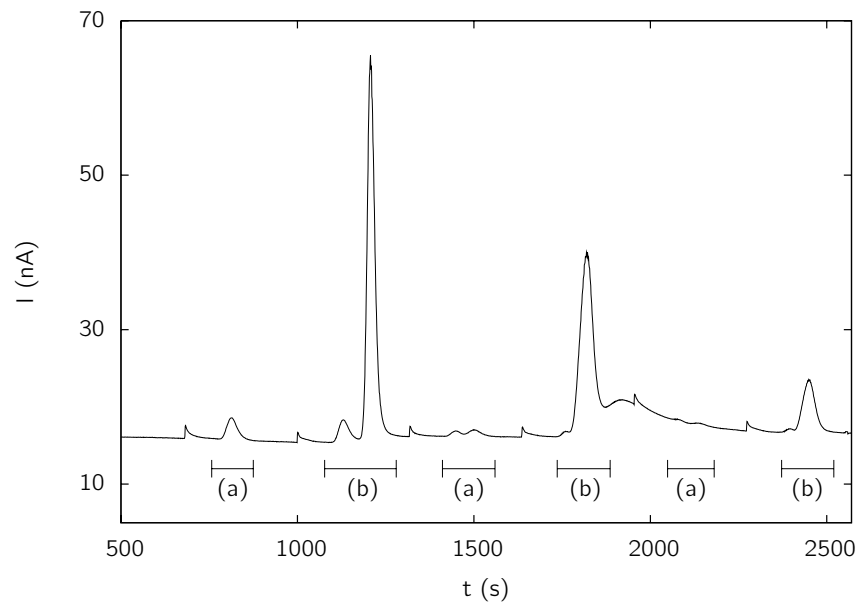


Abbildung 3.21: Ni^{2+} -Kartusche zum Abfangen von Cyanid, Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. (a) Formiat 10 mM, (b) Formiat und CN^- , beide 10 mM.

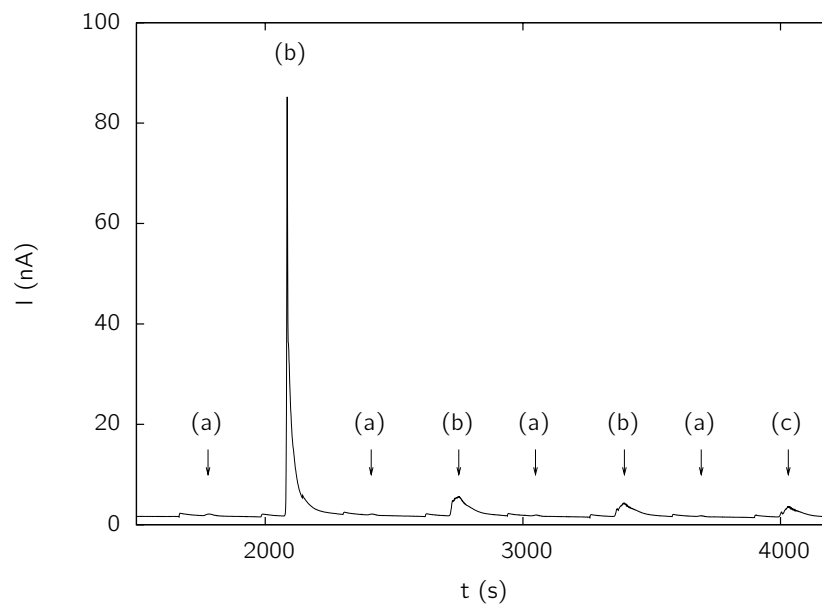


Abbildung 3.22: Pt²⁺-Kartusche zum Abfangen von Cyanid, Pt-Elektrode (W2), Potential 0,3 V. (a) Formiat 10 mM, (b) Formiat und CN⁻, beide 10 mM, (c) CN⁻ 10 mM.

3.4 Durchflusssensor mit Enzymkaskade und Bestimmung von NADH

3.4.1 Vorwort

Nachdem sich Pt-WE als ungeeignet für Cyanid-Durchflussmesssysteme gezeigt hatten, richtete sich der Fokus auf WE aus Graphit. Von einem komplexen System wie dem in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Einschluss von NAD^+ und FDH in PPY wurde vorerst Abstand genommen und ein einfacherer Aufbau angestrebt. Dieser ist in Kapitel 2.13.1 dargestellt. Detektiert wurde hierbei das entstandene NADH. Wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, ist die direkte amperometrische NADH-Detektion problematisch im Bezug auf das anzulegende Potential sowie die Degeneration der WE (*electrode fouling*). Mit dem Hintergrund, dass laut Wang, Angnes und Martinez [WAM92] die Passivierung der WE in Durchflusssystemen nicht sehr stark ausgeprägt ist, sollte dieser Ansatz zunächst dennoch versucht werden, um später den Aufbau eventuell um einen Mediator zu ergänzen.

3.4.2 Auswahl der Elektrode

Zwei zur Auswahl stehende Elektrodentypen (W4 und W5) wurden auf ihre Eignung zur Detektion von NADH untersucht. Dies geschah mittels CV in einer ungerührten Lösung von NADH (10 mM) in Biosensor-Fließmittel pH 7,0, wobei das Potential bei einer Scanrate von $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ zwischen $-0,5$ und $1,0 \text{ V}$ alternierte. Die jeweils zweiten Durchläufe der CV sind in Abbildung 3.23 dokumentiert. Lediglich der Elektrodentyp W4 zeigte hierbei eine elektrochemische Reaktion mit NADH. Deshalb wurde dieser Typ für alle Messungen mit dem enzymatischen Durchflusssensor verwendet. Als Potential für amperometrische Messungen wurde ein Wert von $0,8 \text{ V}$ ausgewählt. Dies stellt einen Kompromiss dar, da ein niedrigeres Potential ein zu geringes Signal ergeben und ein höheres Potential ein stärkeres Basislinienrauschen sowie eine erhöhte Gefahr, auch andere Substanzen zu erfassen, nach sich ziehen würde.

3.4.3 Enzymkartuschen

Die Methode zur Herstellung der eingesetzten Enzymkartuschen ist in Kapitel 2.10.1, die Methode zur Messung der Umsatzraten in den Kapiteln 2.10.2 und 2.10.3 beschrieben. Es wurden Cyanidase-Kartuschen mit Umsatzraten von 76 % (gemessen 26 Tage nach Herstellung), 74 % und 80 % (gemessen jeweils sechs Tage nach Herstellung) erhalten. Eine der Kartuschen besaß nach 104 Tagen und starkem Gebrauch noch eine Aktivität von 43 %. Die FDH-Kartuschen zeigten eine geringere Umsatzrate. Im Detail wurden bei einer Kartusche Umsatzraten von 31 % (50 Tage nach Herstellung) und 26 % (105 Tage nach Herstellung) gemessen. Eine weitere Kartusche zeigte einen Umsatz von 24 % (zehn Tage nach Herstellung). Dieser auf den ersten Blick geringe Umsatz ist bedingt durch die niedrige Konzentration an NAD^+ , da die Reaktion NAD^+

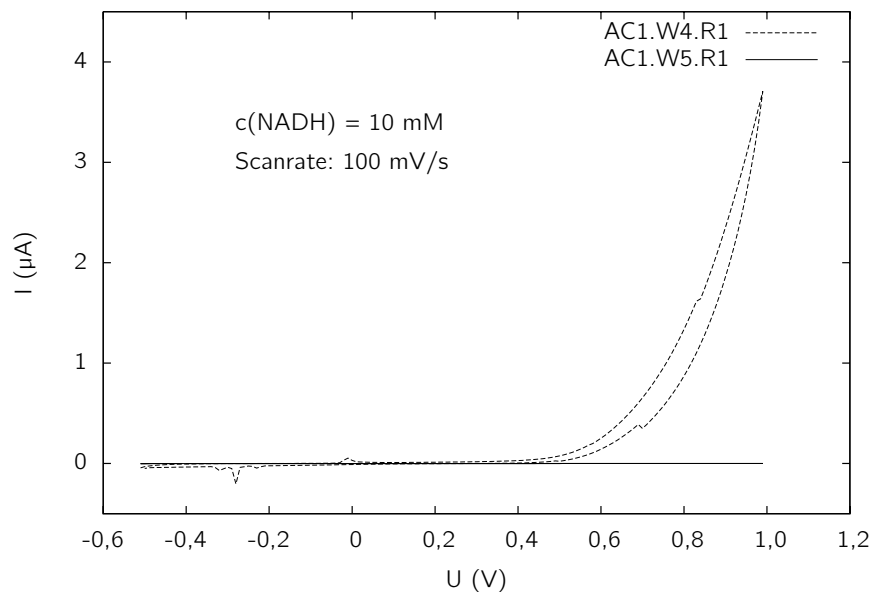


Abbildung 3.23: CV mit NADH, Elektrodentypen W4 und W5.

als Cosubstrat benötigt. Dieses floss in einer Konzentration von 1 mM zum Hauptstrom zu. Die reale NAD^+ -Konzentration in der Kartusche lag somit bei ca. 0,4 mM und schwankte je nach Flussrate von NAD^+ -Lösung und Biosensor-Fließmittel pH 7,0. Diese NAD^+ -Konzentration zur Ermittlung der Umsatzrate war gewählt worden, da unter den beim enzymatischen Durchflusssensor vorliegenden Bedingungen gemessen werden sollte (siehe unten in Kapitel 3.4.4). Bei höheren NAD^+ -Konzentrationen würden auch wesentlich höhere Umsatzraten erreicht werden.

3.4.4 Optimale NAD^+ -Konzentration

Nach erfolgreichem Testen des Sensors (Daten nicht abgebildet) wurde die optimale Konzentration des NAD^+ -Zuflusses bestimmt. Hierzu wurde der Sensor ohne Cyanidase-Kartusche mit dem in Abbildung 3.24 dargestellten Aufbau betrieben. Als Proben dienten NADH-Standard und Formiatstandard in einer Konzentration von jeweils 100 μM . Beide Standards wurden bei verschiedenen NAD^+ -Konzentrationen injiziert, wobei NAD^+ -Konzentrationen von 0, 1, 10 und 100 mM im Zufluss eingesetzt wurden. Das erhaltene Sensogramm (Abbildung 3.25) wurde ausgewertet, indem sowohl die Peakhöhen als auch die Peakflächen der Formiatstandards prozentual auf die Höhen und Flächen der Peaks der NADH-Standards bezogen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Da eine Konzentration von 100 mM einen hohen Verbrauch von kostenintensivem NAD^+ nach sich gezogen hätte, wurde zu einer niedrigeren NAD^+ -Konzentration tendiert. Der Unterschied zwischen 1 und 10 mM fiel

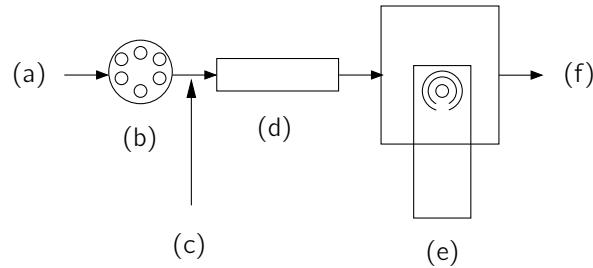


Abbildung 3.24: Schema des Versuchsaufbaus zur Optimierung der NAD^+ -Konzentration. (a) Fließmittel, (b) Injektionsventil, (c) Zufluss NAD^+ -Lösung, (d) FDH-Kartusche, (e) Flusszelle mit Elektrodenchip, (f) Abfall.

relativ gering aus. Da eine Umsatzrate des Formiats von ca. 15 bis 20 % ausreichend erschien, wurde eine NAD^+ -Konzentration von 1 mM im Zufluss für den Betrieb des Durchflusssensors ausgewählt.

3.4.5 Beweis des Prinzips

Um zu zeigen, dass der Sensor nach dem postulierten Prinzip arbeitet, wurde wiederholt Cyanidstandard in einer Konzentration von 100 μM injiziert. Nach zwei Injektionen wurde eine Komponente des Sensors ausgebaut und erneut zweimal mit Standard überprüft. Danach wurde die Komponente wieder in das System eingebracht, zwei Standards vermessen und anschließend eine andere Komponente aus dem System entfernt. Dies wurde für die Komponenten NAD^+ -Zufluss [(e) in Abbildung 2.8 auf Seite 65, ersetzt durch Zufluss von Biosensor-Fließmittel pH 7,0], FDH-Kartusche [(d) in Abbildung 2.8] und Cyanidase-Kartusche [(c) in Abbildung 2.8] durchgeführt. Wie das Sensogramm in Abbildung 3.26 zeigt, sind alle zuvor aufgeführten Komponenten für den erfolgreichen Betrieb des Sensors notwendig. Somit kann als bewiesen gelten, dass der Sensor nach dem vorgestellten Prinzip der Enzymkaskade funktioniert.

Das Sensogramm weist aber noch weitere Aspekte auf. So fiel die Basislinie nach Entfernen sowohl des NAD^+ -Zuflusses als auch der FDH-Kartusche auf ein niedrigeres Niveau ab. Dies lässt darauf schließen, dass FDH auch ohne Formiat einen gewissen

Tabelle 3.6: Umsatzraten in Abhängigkeit von der NAD^+ -Konzentration, Angaben in Prozent

$c(\text{NAD}^+)$ (mM)	Peakfläche	Peakhöhe
0	1,0	1,9
1	20,1	15,7
10	21,0	22,2
100	39,7	44,8

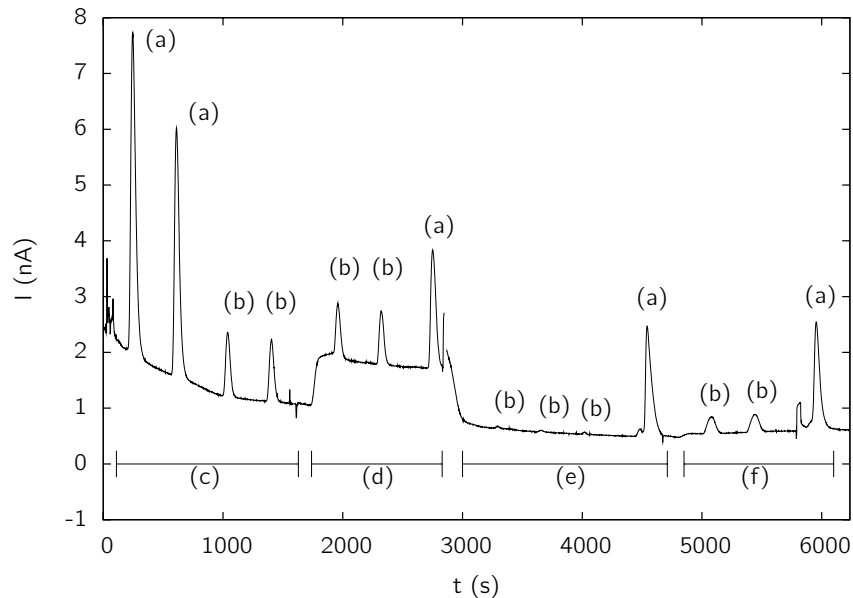


Abbildung 3.25: Bestimmung der optimalen NAD^+ -Konzentration mittels Aufbau aus Abbildung 3.24, Potential 0,8 V. (a) NADH-Injektion, (b) Formiat-Injektion, c(NAD^+) in zufließender Lösung: (c) 10 mM, (d) 100 mM, (e) kein NAD^+ , (f) 1 mM

Teil des NAD^+ zu NADH reduziert. Des Weiteren finden sich bei entfernter Cyanidase-Kartusche kleine Peaks als Reaktion auf die Injektion von Cyanidstandard. Dieses Phänomen wurde durch Wiederholung des Versuchsteils ohne Cyanidase-Kartusche näher untersucht. Die Messung, dargestellt in Abbildung 3.27, zeigte ebenfalls ein leichtes Ansprechen auf Cyanidzugaben; allerdings war dies erst bei der zweiten Injektion deutlich zu erkennen.

Das Signal auf NADH in Abbildung 3.26 betrug zum Ende der Messung nur noch ungefähr 50 % des Signals zu Beginn der Messung. Dies ist wahrscheinlich durch das bereits mehrfach erwähnte *electrode fouling* verursacht.

3.4.6 Signalstabilität

Da das Weglassen von Komponenten schädliche Einflüsse auf den Aufbau haben könnte, indem beispielsweise bei fehlender Cyanidase-Kartusche erhöhte Cyanidmengen an die Elektrode gelangen, sollte die Signalstabilität bei vollständigem Aufbau untersucht werden. Hierfür wurde mehrfach Cyanidstandard in einer Konzentration von 100 μM injiziert. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3.28 wiedergegeben.

Die Signalthöhe blieb dabei wesentlich stabiler als noch bei der Messung in Kapitel 3.4.5. Da dennoch ein Abfall zu beobachten war, wurde mit einer Methode zur

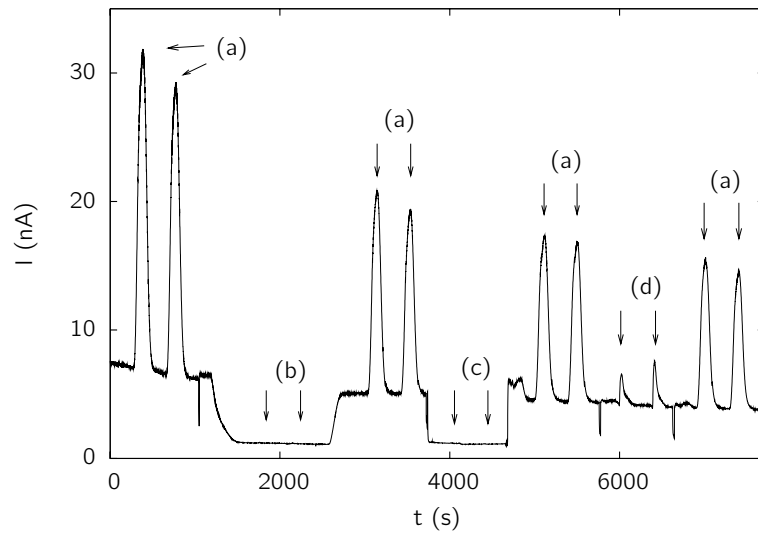


Abbildung 3.26: Überprüfung des Sensorprinzips, Potential 0,8 V. Zugabe von Cyanidstandard (100 μ M) bei jedem Pfeil. (a) Kompletter Aufbau nach Abbildung 2.8 auf Seite 65, (b) NAD^+ durch Puffer ersetzt, (c) ohne FDH-Kartusche, (d) ohne Cyanidase-Kartusche.

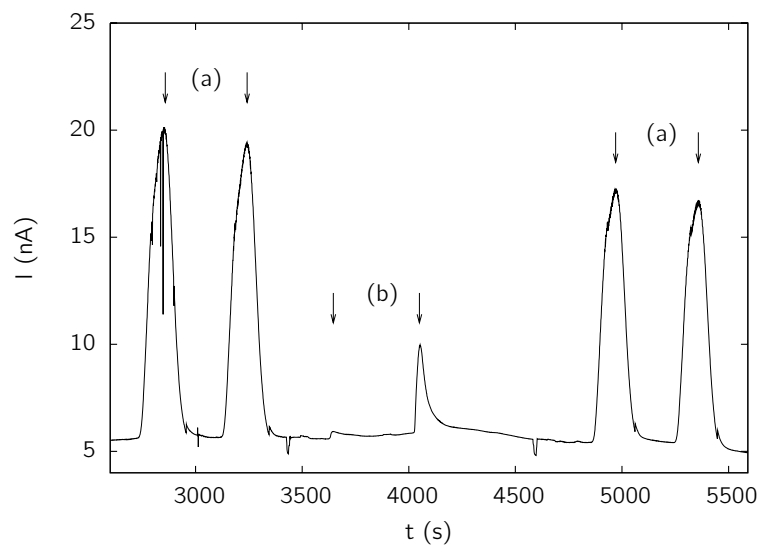


Abbildung 3.27: Überprüfung des Sensors ohne Cyanidase-Kartusche, Potential 0,8 V. Zugabe von Cyanidstandard (100 μ M) bei jedem Pfeil. (a) Kompletter Aufbau nach Abbildung 2.8 auf Seite 65, (b) ohne Cyanidase-Kartusche.

elektrochemischen Regeneration von Elektroden versucht, auch diesen Abfall zu verhindern. Wang und Lin beschreiben eine solche Methode [WL88]. Diese wurde von den Autoren für Glaskohlenstoff-Elektroden verwendet und wurde hier auf Eignung für die vorliegenden Graphit-Elektroden getestet. Die von Wang und Lin für NADH vorgegebenen Parameter (15 bzw. 30 s zwischen +1,8 und -1,8 V bei 10 Hz alternieren) konnten mit dem PalmSens aufgrund von Beschränkungen im Arbeitsbereich nicht vollständig realisiert werden. Daher wurde pro Regeneration für 20 s von +1,8 bis -1,8 V bei der maximal einstellbaren Rate von $12 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ alterniert.

Hierfür wurde ein Cyanidstandard in einer Konzentration von 4 mM mehrfach vermessen. Diese hohe Konzentration wurde gewählt, um durch erhöhte NADH-Konzentrationen einen größeren Abfall des Signals zu erzeugen und so die Wirksamkeit der Regeneration besser beurteilen zu können. Nach der Vermessung von drei Standards ohne vorherige Regeneration wurden vier Standards jeweils nach einer Regeneration injiziert. Zuletzt wurde ein weiterer Standard vermessen, ohne zuvor die Elektrode elektrochemisch zu behandeln. Von einer erfolgreichen Regeneration wurde erwartet, dass die Signale, repräsentiert durch die Peakhöhe, nach einer Regeneration keine oder nur eine geringe Abschwächung im Vergleich zum vorherigen Signal zeigen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Peakhöhen der ersten drei Standards fielen wie erwartet ab. Die Regeneration vor dem vierten Standard zeigte einen Effekt; die Peakhöhe war gegenüber dem vorherigen Standard deutlich erhöht. Die Peakhöhe nach Zugabe weiterer Standards mit vorheriger elektrochemi-

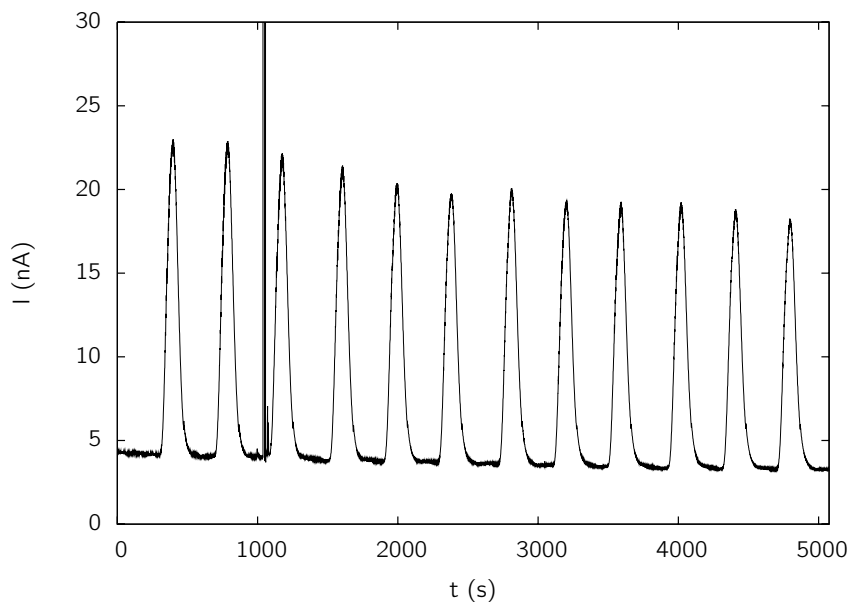


Abbildung 3.28: Entwicklung des Signals bei wiederholter Injektion von Cyanidstandard $100 \mu\text{M}$, Potential $0,8 \text{ V}$.

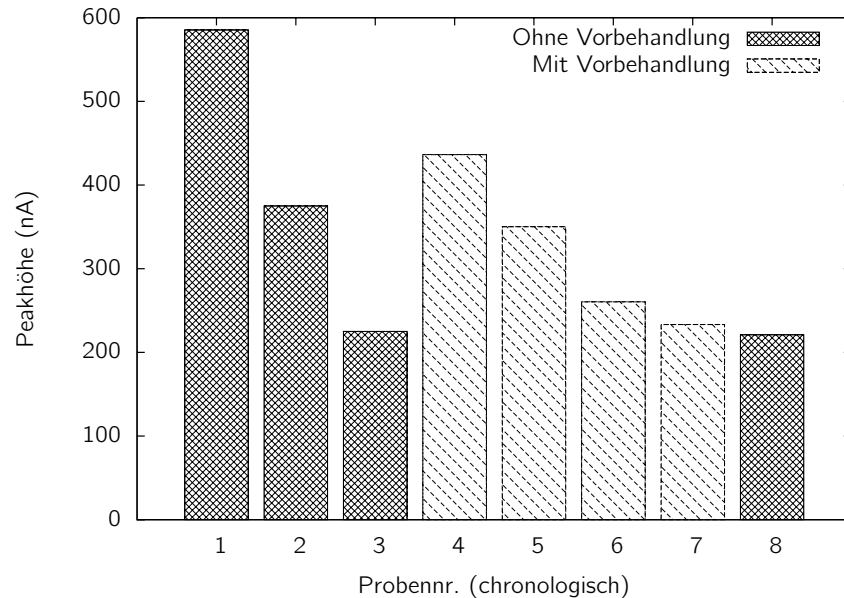


Abbildung 3.29: Entwicklung der Sensorantwort bei einem Potential von 0,8 V auf wiederholte Zugaben von Cyanidstandard (4 mM), mit und ohne CV-Behandlung vor Zugaben.

scher Behandlung verblieb aber nicht auf diesem Niveau, sondern sank erneut ab, um sich anschließend auf einen gewissen Wert einzupendeln. Die letzte Probe, vermessen ohne elektrochemische Behandlung vor der Injektion, verblieb ebenfalls auf diesem Niveau, so dass die Regenerationsmethode bis auf die Erhöhung des Signals nach erstmaliger Anwendung keine weitere Auswirkung zu haben schien.

Unter diesen Umständen wurde auf die Anwendung dieser Methode verzichtet. Es wurde aber teilweise am Ende von Messungen nochmals ein Cyanidstandard injiziert, um die Gesamtabschwächung des Signals während der Messungen quantifizieren zu können. Die Abschwächung wurde allerdings bei Auswertungen vernachlässigt.

3.4.7 Linearer Bereich

In den bisher gezeigten Messungen waren nur Standards gleichen Gehalts verwendet worden. Um den linearen Bereich des Sensors zu bestimmen, wurden Cyanidkonzentrationen von 20 bis 1000 μM vermessen (Abbildung 3.30). Pro Standard wurden dabei drei Injektionen vorgenommen, wobei allerdings nach der ersten Injektion des letzten Standards mit 1000 μM die NAD^+ -Lösung auszugehen drohte. Um einer Einführung von Luft in die Kartuschen vorzubeugen, wurde die Messung vorzeitig abgebrochen.

Abbildung 3.31 zeigt die Auftragung der Peakfläche gegen die Cyanidkonzentration. In Abbildung 3.32 ist die Peakhöhe gegen die Cyanidkonzentration aufgetragen. In

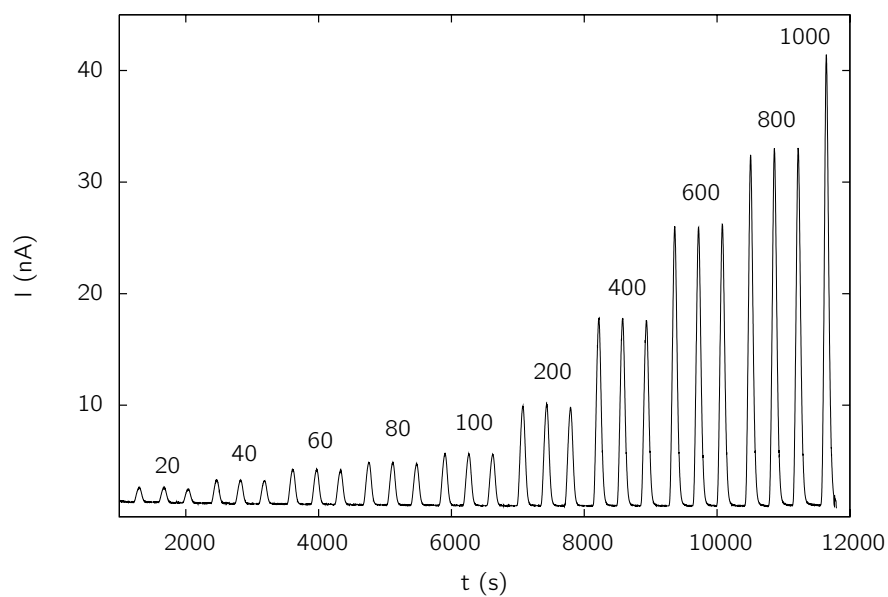


Abbildung 3.30: Überprüfung auf Linearität, Potential 0,8 V. Zahlen geben die Konzentration der Cyanidstandards in μM an.

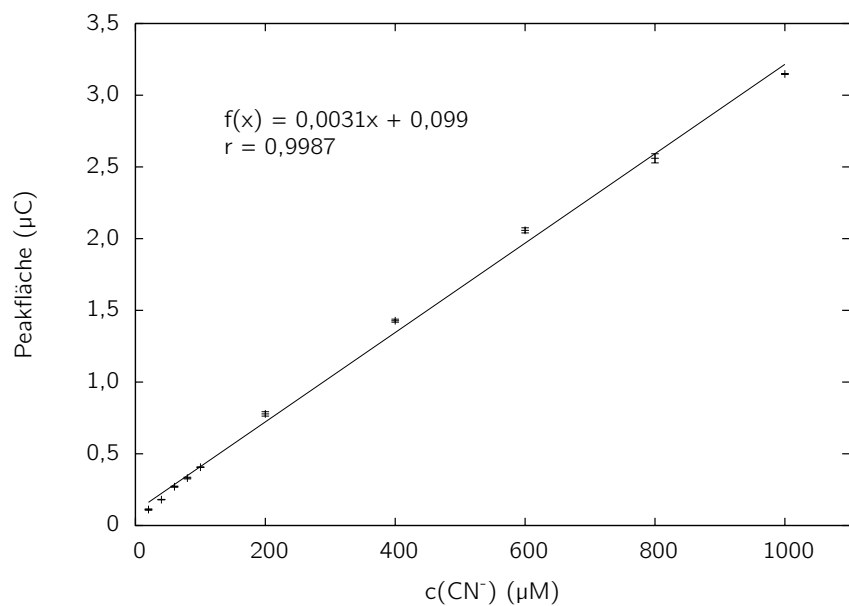


Abbildung 3.31: Korrelation zwischen Peakfläche und Cyanidkonzentration.

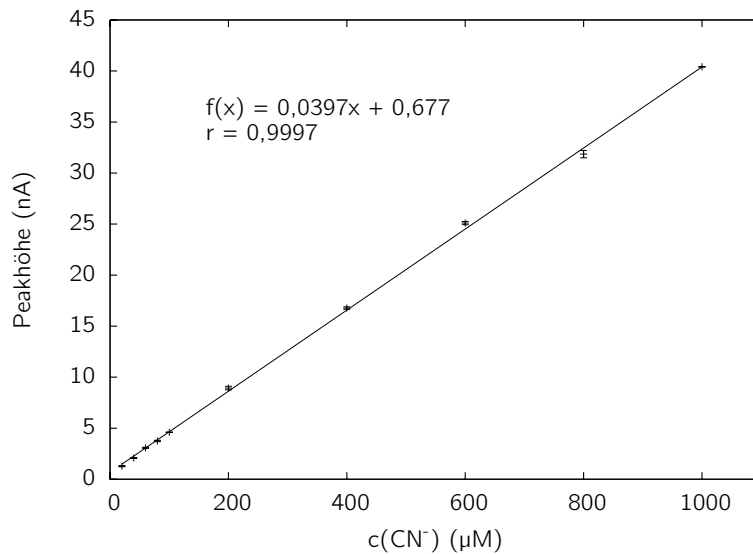


Abbildung 3.32: Korrelation zwischen Peakhöhe und Cyanidkonzentration.

beide Diagramme sind die Standardabweichungen eingezeichnet. Mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration, die relative Standardabweichungen von 4,4 % (Peakhöhen) bzw. 4,3 % (Peakflächen) besaß, bewegten sich die relativen Standardabweichungen im Bereich zwischen 0,1–2 %. Da bei der Auswertung nach der Peakfläche eine leichte Krümmung zu erkennen ist, wurde die Peakhöhe für weitere Auswertungen gewählt.

3.4.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden Cyanidstandards in Konzentrationen zwischen 0 und 2 μM jeweils dreifach vermessen. Die Sensogramme sind in Abbildung 3.33 und 3.34 zu finden. Hier zeigt sich, dass kleine Unregelmäßigkeiten im System wie z. B. Partikel oder elektromagnetische Störungen im Stromnetz und der Umgebung das regelmäßige Bild des Sensogramms, wie es in Abbildung 3.30 zu finden ist, stören. Die Sensogramme konnten dennoch ausgewertet werden. Es wurde pro Messung über linearer Regression eine Gerade aus den Größen Peakhöhe und Cyanidkonzentration aufgestellt und daraus die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. In der Fachwelt existiert hierfür keine einheitliche Berechnungsmethode. Selbst die in Deutschland gültige DIN 32645 kann je nach Berechnung unterschiedliche Werte ergeben [Nei03]. In dieser Arbeit wurde die Methode herangezogen, die international für chromatographische Verfahren gebräuchlich ist. Im Detail wurde die Höhe des Rauschens der Basislinie ermittelt und für die Nachweisgrenze mit 3 bzw. für die Bestimmungsgrenze mit 10 multipliziert. Die durchschnittliche Höhe des Signals des Blindwerts (Konzentration von 0) wurde in beiden Fällen addiert, wodurch dann

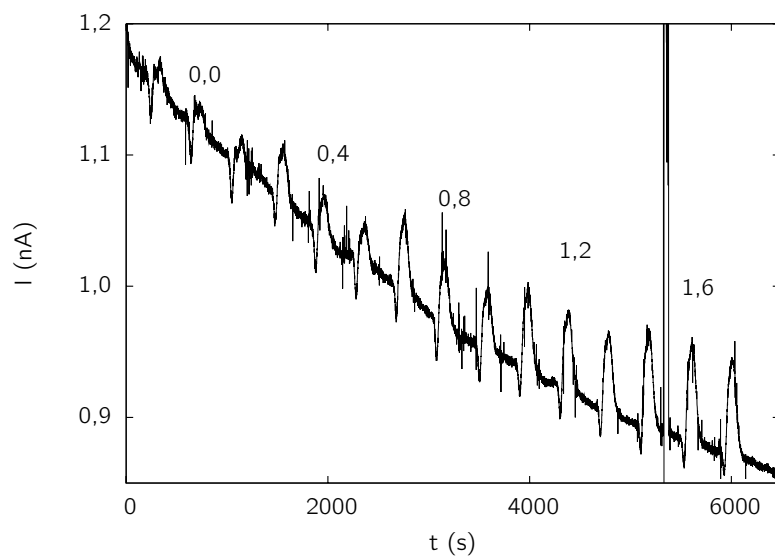


Abbildung 3.33: Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Messung 1, Potential 0,8 V. Zahlen geben die Konzentration der Cyanidstandards in μM an (je drei Messungen pro Standard, Beschriftung jeweils über der mittleren Messung).

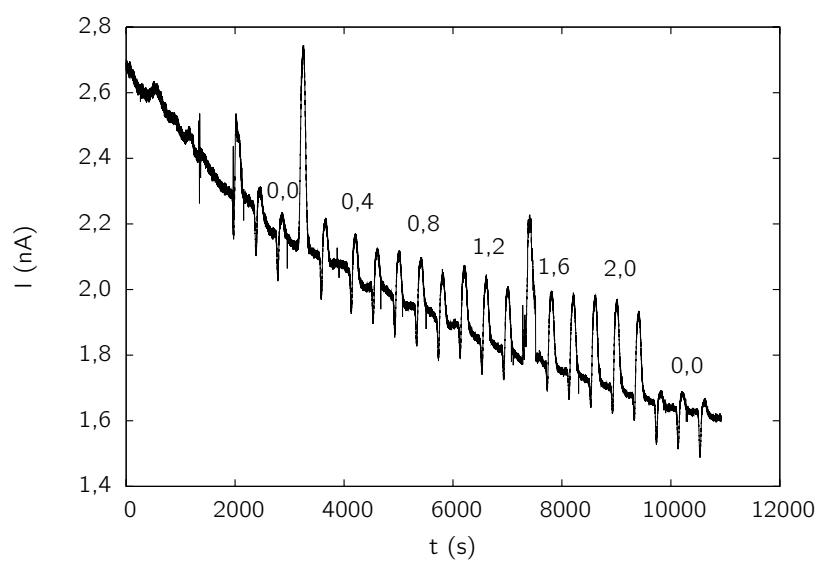


Abbildung 3.34: Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Messung 2, Potential 0,8 V. Zahlen geben die Konzentration der Cyanidstandards in μM an (je drei Messungen pro Standard, Beschriftung jeweils über der mittleren Messung).

Tabelle 3.7: Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Werte in μM .

	Nachweisgrenze	Bestimmungsgrenze
Messung 1	0,66	2,27
Messung 2	0,70	2,39

der jeweils gesuchte Wert erhalten wurde. Bei der Berechnung des durchschnittlichen Blindwerts wurde allerdings der dritte Messwert der zweiten Messreihe nicht miteinbezogen, da es sich offensichtlich um einen Ausreißer handelte. Die auf diese Weise gewonnenen Werte sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Unter alleiniger Berücksichtigung des jeweils schlechteren Werts kann die Nachweisgrenze mit $0,7 \mu\text{M}$ und die Bestimmungsgrenze mit $2,4 \mu\text{M}$ angegeben werden. Dies entspricht einer Massenkonzentration von 18 bzw. $62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.4.9 Störungen

Als Modellsubstanzen zur Untersuchung von Querempfindlichkeiten wurden verschiedene Nitrile (Benzonitril, Isovaleronitril, Acetonitril, Mandelonitril), Ammoniumthiocyanat und Sulfid ausgewählt. Die Strukturformeln der Nitrile sind in Abbildung 3.35 dargestellt.

Diese Auswahl erfolgte wegen struktureller (Nitrile, Thiocyanat) oder chemischer (Sulfid) Ähnlichkeiten zu Cyanid. Mandelonitril nimmt hierbei eine Sonderstellung ein: Es handelt sich um ein α -Hydroxynitril, das in wässriger Lösung zu Benzaldehyd und Cyanid zerfällt (Abbildung 1.10 auf Seite 31). Deshalb wurde hier ein Ansprechen des Sensors erwartet. Von den jeweiligen Substanzen wurden Stammlösungen in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 hergestellt. Davon wiederum wurden Verdünnungen in

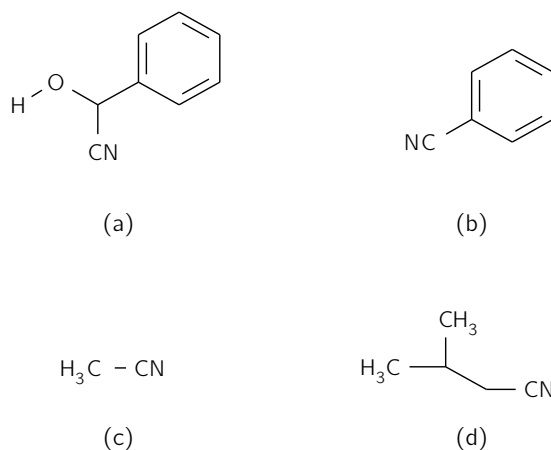


Abbildung 3.35: Strukturen untersuchter Nitrile. (a) Mandelonitril, (b) Benzonitril, (c) Acetonitril, (d) Isovaleronitril.

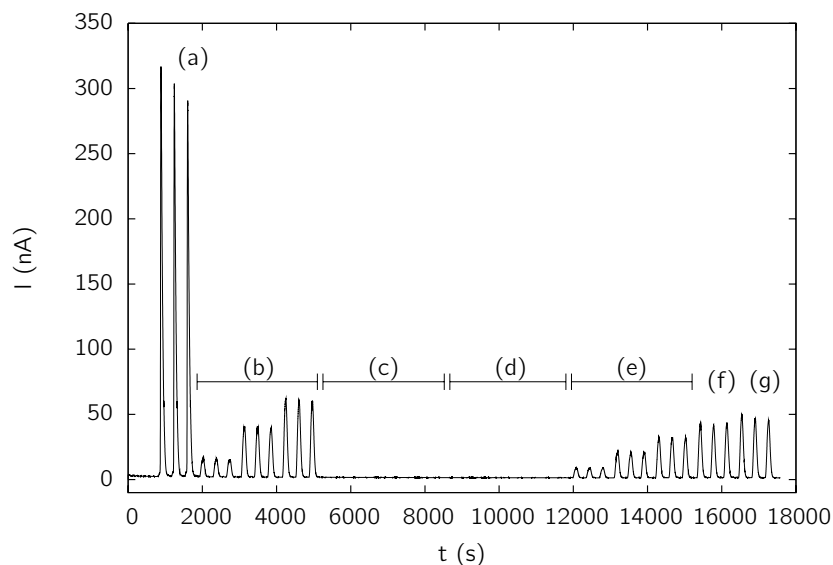


Abbildung 3.36: Störungen, Messung 1 von 2, Potential 0,8 V. Falls nicht anders angegeben, Proben mit $c = 0,1, 0,3, 0,5$ mM. (a) NADH 0,5 mM, (b) Cyanid, (c) Isovaleronitril, (d) Benzonitril, (e) Mandelonitril. (f) Mandelonitril 0,5 mM frisch verdünnt, (g) Cyanid 0,5 mM.

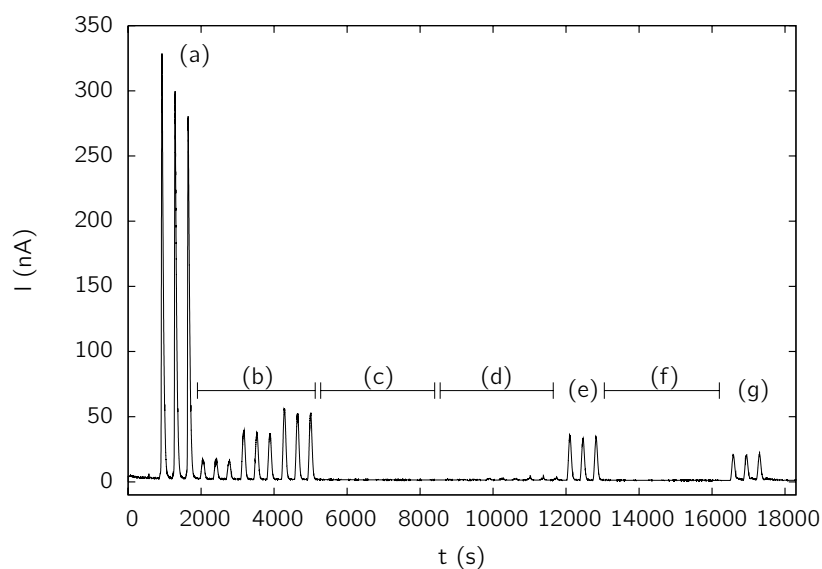


Abbildung 3.37: Störungen, Messung 2 von 2, Potential 0,8 V. Falls nicht anders angegeben, Proben mit $c = 0,1, 0,3, 0,5$ mM. (a) NADH 0,5 mM, (b) Cyanid, (c) Acetonitril, (d) NH_4SCN , (e) Cyanid 0,5 mM, (f) Na_2S , (g) Cyanid 0,5 mM.

Tabelle 3.8: Querempfindlichkeiten

Substanz	Steigung (%)
Acetonitril	0,01
Ammoniumthiocyanat	6,82
Benzonitril	0,10
Isovaleronitril	0,05
Mandelonitril	49,46
Natriumsulfid	0,41

Biosensor-Fließmittel pH 7,0 vorgenommen, so dass sich genau bekannte Konzentrationen von ungefähr 0,1, 0,3 und 0,5 mM ergaben. Diese Verdünnungen wurden je dreimal mit dem enzymatischen Sensor vermessen. Zuvor waren eine NADH-Lösung in einer Konzentration von 0,5 mM und Cyanidstandards in den Konzentrationen 0,1, 0,3 und 0,5 mM injiziert worden. Am Ende der Messung sowie vor der Sulfidinjektion wurde der höchstkonzentrierte Cyanidstandard (0,5 mM) nochmals vermessen, um die Abnahme des Signals quantifizieren zu können. Die Sensogramme sind in den Abbildungen 3.36 und 3.37 wiedergegeben. Ausgewertet wurden die Sensogramme mittels linearer Regression (Peakhöhen gegen Konzentration). Die Steigungen der erhaltenen Geraden sind, bezogen auf die Steigung der Cyanidstandards, in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Lediglich gegenüber Thiocyanat zeigte der Sensor eine geringe Querempfindlichkeit; die anderen Substanzen mit Ausnahme von Mandelonitril störten nicht. Wie bereits erwähnt, rührt das Ansprechen des Sensors auf Mandelonitril von dem Zerfall in Benzaldehyd und Cyanid. Die Probe mit Mandelonitril war ungefähr vier Stunden nach Herstellung der Stammlösung injiziert worden. In einem ergänzenden Versuch wurde der Gehalt an Cyanid in einer Verdünnung von Mandelonitril vier Stunden nach Ansetzen der Lösung mittels des in Kapitel 2.12.1 vorgestellten Farbassays vermessen. Dabei zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt 66 % des Mandelonitrils zerfallen waren, was in etwa mit den durch den enzymatischen Sensor erhaltenen Werten übereinstimmte.

3.4.10 Realproben

Um die Robustheit des Sensors im Hinblick auf komplexe Matrices zu testen, wurden Extrakte aus Pflanzen, die CG enthalten, hergestellt. Als Pflanzenmaterial wurden Blätter des Kirschlorbeers und Bittere Mandeln verwendet.

Der erste Versuch wurde mit einem Kirschlorbeerblatt unternommen. Dieses wurde ähnlich zu der in Kapitel 2.11 beschriebenen Methode extrahiert, wobei allerdings beim Verreiben noch etwas Biosensor-Fließmittel pH 7,0 zugefügt wurde. Die Filtration wurde nicht mit einer Fritte und anschließendem Nachspülen, sondern ohne Verdünnung mit Hilfe eines Faltenfilters durchgeführt. Dieser Extrakt wurde nach Verdünnen mit

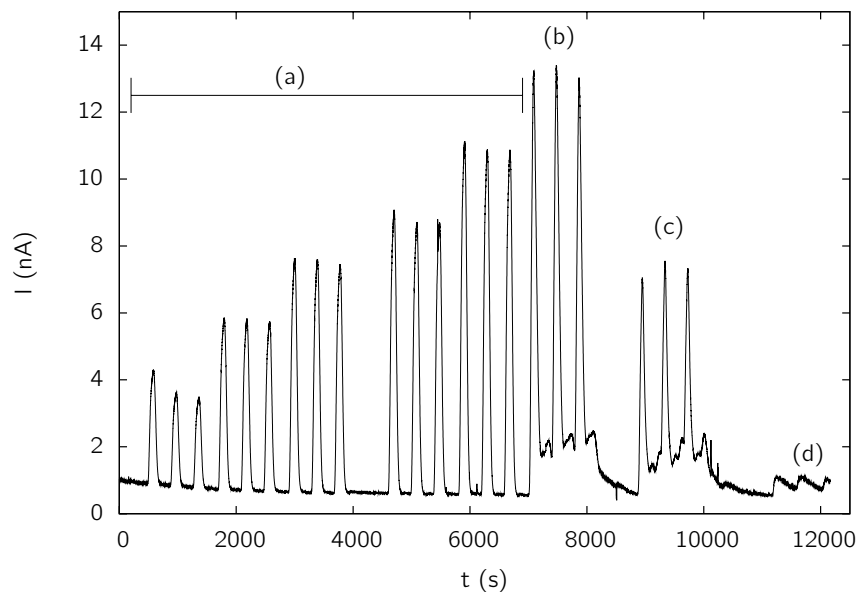


Abbildung 3.38: Realprobe: *Prunus laurocerasus*, Potential 0,8 V. (a) CN^- 20,7, 41,3, 62,0, 82,7 und 103,3 μM , (b) *Prunus*-Extrakt, (c) *Prunus*-Extrakt, NAD^+ -Zufuhr durch Puffer ersetzt, (d) CN^- 103,3 μM , NAD^+ -Zufuhr durch Puffer ersetzt.

NaOH 30 mM mit dem in Kapitel 2.12.1 beschriebenen Farbossay und nach Verdünnen mit Biosensor-Fließmittel pH 7,0 (1 auf 20) mit dem enzymatischen Sensor vermessen. Als Cyanidstandards wurden für beide Methoden Verdünnungen derselben Cyanid-Stammlösung mit den gleichen Lösungen wie für den Extrakt verwendet. Die Cyanid-Stammlösung war durch Einwiegen von Kaliumcyanid und Auffüllen mit Puffer-Alkali-Mischung auf 50,0 mL hergestellt worden.

Bei Messung mit dem enzymatischen Sensor wurde erwartet, dass der Extrakt viele Bestandteile wie z. B. Flavonoide enthält, die bei 0,8 V oxidiert werden können und dadurch das Ergebnis erheblich verfälschen. Daher wurde der NAD^+ -Zufluss nach einer Dreifachmessung durch einen Zufluss von reinem Biosensor-Fließmittel pH 7,0 ersetzt und eine erneute Dreifachmessung des Extrakts vorgenommen. Somit sollte die Kaskade von Cyanid zu NADH unterbrochen sein und das Signal dem Nicht-Cyanid-Anteil des Signals bei NAD^+ -Zufluss entsprechen, womit der Cyanid-Anteil durch Subtraktion der Peakhöhe ohne NAD^+ -Zufluss von der Peakhöhe mit NAD^+ -Zufluss erhalten werden kann.

Abbildung 3.38 enthält das Sensogramm des Versuchs. Wie zu sehen ist, fiel das Signal nach den Extrakt-Peaks nicht wieder auf die Basislinie ab, bevor das nächste Signal einsetzte. Dies bereitete Probleme bei der Auswertung, da entschieden werden musste, ob die Ermittlung der Peakhöhen von der theoretischen, extrapolierten Basis-

linie oder von der tatsächlich vorhandenen Peakbasis aus vorzunehmen war. Allerdings ergaben beide Berechnungen ähnliche Werte. Ausgehend von einer extrapolierten Basislinie wurde nach Abzug der Peakhöhe ohne NAD^+ -Zufluss eine Cyanidkonzentration von 1011 μM erhalten, während mit der realen Peakbasis eine Cyanidkonzentration von 1059 μM berechnet wurde. Die Vermessung des Extrakts mit dem Farbassay ergab dagegen eine wesentlich niedrigere Konzentration von 582 μM . Somit lieferte der enzymatische Sensor verglichen mit dem Farbassay um 73 bzw. 82 % zu hohe Werte. Der Grund für diesen Fehler ist nicht in der Präzision zu suchen, da sich diese mit relativen Standardabweichungen von 1,7 % bei NAD^+ -Zufluss und 3,7 % ohne Zufluss von NAD^+ (mittels extrapolierte Basislinie erhaltene Werte) in einem akzeptablen Bereich befand.

Um zu untersuchen, ob dies eine grundsätzliche Tendenz des enzymatischen Durchflusssensors darstellte oder nur ein Einzelfall war, wurde im Folgenden eine höhere Anzahl von Extrakten vermessen. Dazu wurden je drei Extrakte aus Kirschlorbeerblättern und Bittermandeln nach dem Verfahren in Kapitel 2.11 hergestellt. Die Extrakte wurden allerdings nicht wie dort beschrieben mit einer Fritte und Nachspülen, sondern ohne Nachspülen zunächst mit einem Falten- und danach mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 μm) filtriert.

Die Bestimmung der Cyanidkonzentration mittels Farbassay sowie die Herstellung und Handhabung der Cyanidstandards erfolgte wie im vorherigen Versuch. Die Durchführung der Messung mit dem enzymatischen Sensor wurde dagegen leicht verändert. So wurden Standards und Proben nicht mehr dreifach, sondern nur einfach vermessen. Zudem wurde zu Beginn der Messung NADH injiziert, um zu testen, ob noch eine ausreichende Umsetzung des Cyanids erfolgte. Der Abfall des Sensorsignals wurde durch Injektion des höchstkonzentrierten Cyanidstandards am Ende der Messung unter NAD^+ -Zufluss bestimmt. Um die Interpretation der Daten zu vereinfachen, wurde nach Injektion der Kirschlorbeerproben länger gewartet, bevor die nächste Probe in das System eingebracht wurde. Zuletzt wurde die Verdünnung der Extrakte für die Messung mit dem enzymatischen Sensor so vorgenommen, dass die Peakhöhe innerhalb der Peakhöhen der Cyanidstandards lag. Wie Abbildung 3.39 zeigt, wurden jedoch im Falle der Kirschlorbeerextrakte zunächst zwei fehlerhaft verdünnte Proben eingesetzt. Zur Auswertung, die wie beim vorherigen Versuch durch Subtraktion der Peakhöhen mit und ohne NAD^+ -Zufluss erfolgte, gelangten aber nur die nachfolgenden, richtigen Verdünnungen (1 auf 40).

Die Ergebnisse beider Methoden sind in Tabelle 3.9 gegenübergestellt. Die erhaltenen Cyanidkonzentrationen der Bittermandelproben zeigen hier eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Methoden, wohingegen der enzymatische Sensor bei den Kirschlorbeerextrakten wie zuvor viel zu hohe Werte anzuzeigen scheint. Allerdings könnten Extraktbestandteile auch den Farbassay stören und der Fehler somit zum Teil beim Farbassay liegen. So schaltet das Deutsche Institut für Normung (DIN) dem Farbassay aufgrund vieler Störungen bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen eine Abtrennung des Cyanids von der restlichen Probe vor [din81]. Das

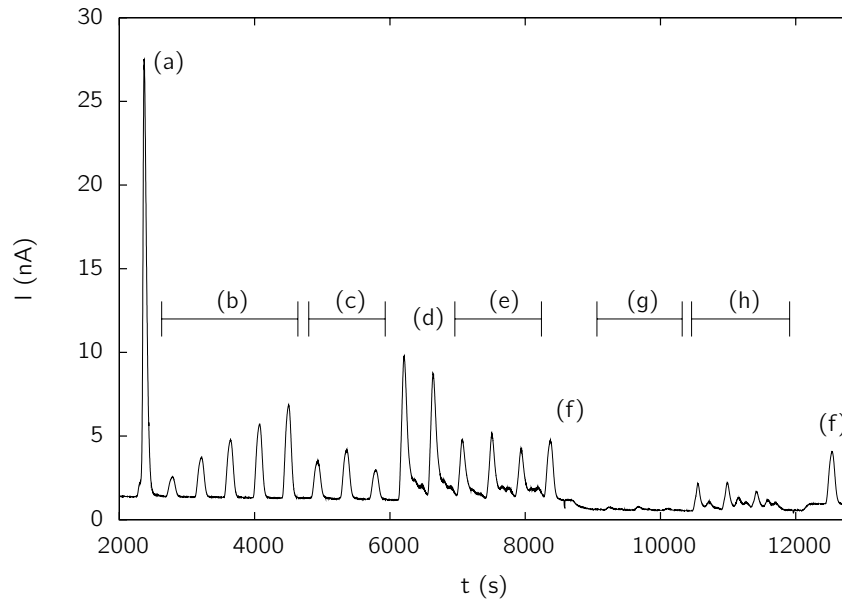


Abbildung 3.39: Realproben: 3 Bittermandel- und 3 Kirschchlorbeerproben, Potential 0,8 V. (a) NADH-Standard, (b) CN^- -Kalibration, (c) Bittermandelproben, (d) Kirschchlorbeerproben in falscher Verdünnung, (e) Kirschchlorbeerproben in richtiger Verdünnung, (f) höchster Cyanidstandard, (g) Bittermandelproben ohne NAD^+ -Zufluss, (h) Kirschchlorbeerproben ohne NAD^+ -Zufluss.

hierfür in der Norm vorgesehene Verfahren wurde, obwohl ursprünglich nicht für Pflanzenextrakte erstellt, nachfolgend in leicht modifizierter Form angewendet. Die genaue Vorschrift sowie eine Erklärung der Modifikationen gegenüber DIN 38405 finden sich in Kapitel 2.12.2.

Zunächst wurde die Wiederfindungsrate der DIN-Methode mit genau abgewogenem und mit Puffer-Alkali-Lösung auf 100,0 mL aufgefüllten Kaliumcyanid bestimmt. Die

Tabelle 3.9: 6 Pflanzenextrakte, Ergebnis in mM

	Farbassay	Enzymat. Sensor	Differenz
Mandel 1	1,39	1,65	+19,0 %
Mandel 2	2,30	2,26	-1,6 %
Mandel 3	1,41	1,33	-5,7 %
Kirschchlorbeer 1	1,41	1,62	+15,5 %
Kirschchlorbeer 2	0,91	1,83	+100,9 %
Kirschchlorbeer 3	0,77	1,52	+97,2 %

erhaltene Absorptionslösung wurde mittels Farbassay (Kapitel 2.12.1) gegen Standards vermessen. Nach dreifacher Bestimmung wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 95,3 % mit einer relativen Standardabweichung von 2,8 % ermittelt. Eine mit Wasser durchgeführte Blindwertbestimmung ergab, dass der DIN-Aufbau praktisch blindwertfrei war.

Anschließend wurden drei Kirschlorbeer-Rohextrakte nach der in Kapitel 2.11 beschriebenen Methode hergestellt. Diese Extrakte wurden dann mittels der modifizierten Methode nach DIN 38405 weiterbehandelt. Sowohl die dadurch gewonnenen Absorptionslösungen als auch die Rohextrakte wurden mit Farbassay und enzymatischem Sensor vermessen. Die Sensogramme der Messungen mit dem enzymatischen Sensor finden sich in den Abbildungen 3.40, 3.41 und 3.42, die Ergebnisse beider Methoden in Tabelle 3.10.

Diese Ergebnisse können nun durch Vergleiche einzelner Ergebnisse weiter ausgewertet werden (Tabelle 3.11). Zur Bestimmung der Robustheit wurde der Vergleich zwischen der Vermessung des Rohextrakts mit dem enzymatischen Sensor und der Absorptionslösung mittels Farbassay herangezogen. Hier zeigt sich im Gegensatz zu den beiden vorherigen Versuchen eine sehr gute Übereinstimmung. Wie vermutet, beinhalten die Rohextrakte Stoffe, die den Farbassay stören, wie die jeweils im Vergleich zu den Absorptionslösungen niedrigeren erhaltenen Konzentrationen bei Messung der Rohextrakte beweisen. Im Falle der Messung der Absorptionslösungen mit dem enzymatischen Sensor wurde erwartet, dass die hierbei erhaltenen Ergebnisse mit denen durch enzymatische Vermessung der Rohextrakte übereinstimmen. Es finden sich jedoch deutlich niedrigere Konzentrationen bei Vermessung der Absorptionslösungen. Die Wiederfindungsrate sowie Verdünnungen beim Herstellen der Absorptionslösungen nach DIN sind hierbei bereits berücksichtigt.

Tabelle 3.10: Kirschlorbeerproben mit und ohne Cyanidisolierung, Cyanidgehalt in μM .

	Farbassay		Enzymatischer Sensor	
	Rohextrakt	Absorptionslösung	Rohextrakt	Absorptionslösung
Probe 1	877,6	1015,4	1078,6	832,3
Probe 2	892,1	993,5	813,1	693,9
Probe 3	851,2	880,2	858,8	700,7

Tabelle 3.11: Kirschlorbeerproben: Vergleich der Ergebnisse.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Rohextrakt Enzymat. Sensor gegen Absorptionslg. Farbassay	+6,2 %	-18,2 %	-2,4 %
Farbassay: Rohextrakt gegen Absorptionslg.	-13,6 %	-10,2 %	-3,2 %
Enzymat. Sensor: Absorptionslg. gegen Rohextrakt	-22,8 %	-14,7 %	-18,4 %

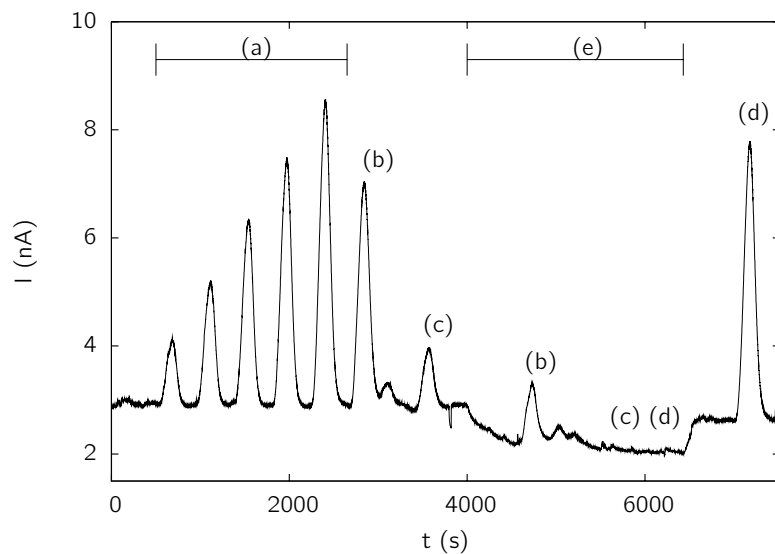


Abbildung 3.40: Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschlorbeer, Sensogramm Enzymsensor (1/3), Potential 0,8 V. (a) CN^- -Kalibration, (b) Kirschlorbeerprobe, (c) Absorptionslösung, (d) höchster Cyanidstandard, (e) Puffer statt NAD^+ -Zufluss.

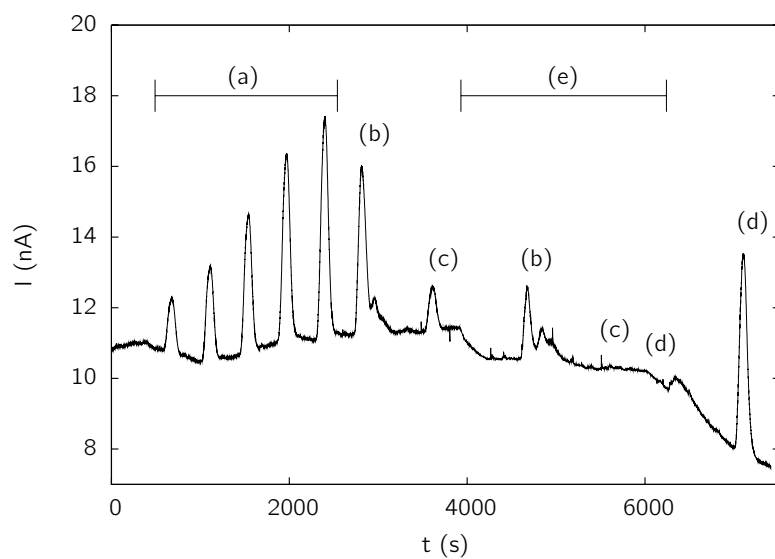


Abbildung 3.41: Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschlorbeer, Sensogramm Enzymsensor (2/3), Potential 0,8 V. (a) CN^- -Kalibration, (b) Kirschlorbeerprobe, (c) Absorptionslösung, (d) höchster Cyanidstandard, (e) Puffer statt NAD^+ -Zufluss.

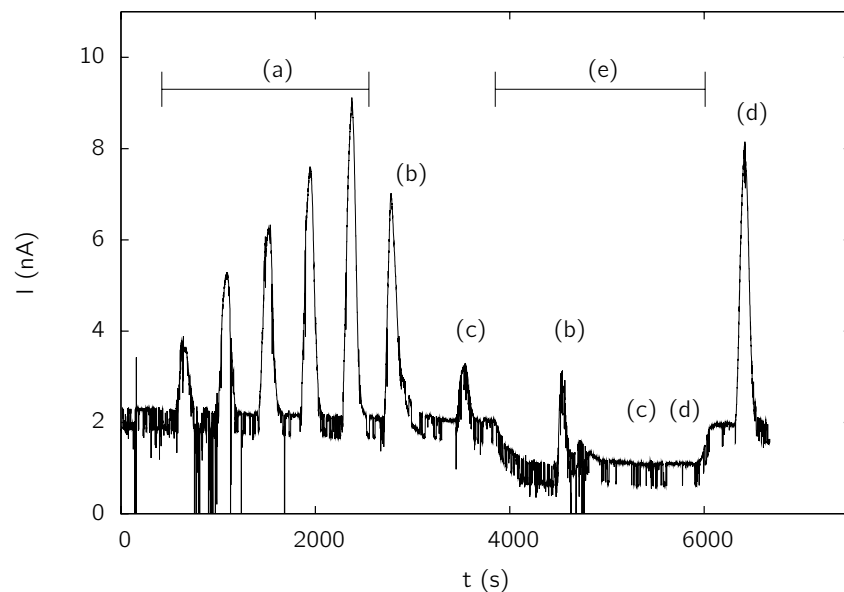


Abbildung 3.42: Vergleich DIN-Methode/Enzymsensor bei Realprobe: Kirschlorbeer, Sensogramm Enzymsensor (3/3), Potential 0,8 V. (a) CN^- -Kalibration, (b) Kirschlorbeerprobe, (c) Absorptionslösung, (d) höchster Cyanidstandard, (e) Puffer statt NAD^+ -Zufluss.

3.4.11 Lagerstabilität

Zur Untersuchung der Lagerstabilität des enzymatischen Durchflusssensors wurden eine Cyanidase- und eine FDH-Kartusche separat für diesen Lagerversuch hergestellt und ausschließlich für diesen verwendet. Ebenso wurden zwei Elektrodenchips vom Typ W4 nur für diesen Versuch reserviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden drei Cyanidstandards mit genau bekannten Konzentrationen von ungefähr 20, 60 und 100 μM jeweils 3× vermessen. Als Maß für die Sensorempfindlichkeit wurde die Steigung der Geraden aus Peakhöhe und Cyanidkonzentration herangezogen.

Elf Tage nach Herstellung der FDH-Kartusche und 21 Tage nach Herstellung der Cyanidase-Kartusche wurde die Empfindlichkeit des ersten Chips zum ersten Mal bestimmt. Die erste Vermessung des zweiten Chips fand sieben Tage nach dem Beginn der Messungen mit dem ersten Chip statt. Der Verlauf der Sensorempfindlichkeiten findet sich in Abbildung 3.43.

Zunächst fiel bei beiden Chips die Steigung auf einen verglichen mit der ersten Messung niedrigeren Wert, um nach einigen Messungen sprunghaft anzusteigen und auf hohem Niveau zu verharren. Dies war durch die Reinigungsprozedur des Sensoraufbaus verursacht. In den ersten Tagen dieses Versuchs wurde der Aufbau inklusive Durchflussszelle nach der Messung gründlich mit H_2O durchspült. Für diesen Zweck

war es notwendig, einen Elektrodenchip in der Durchflusszelle zu belassen. Da der Chip, mit dem zuvor die Messung stattgefunden hatte, auch gespült werden musste, wurde dieser dafür verwendet. Durch einen Bedienfehler behielt der Potentiostat bei den ersten Messungen das angelegte Potential bei.

Am Tag 7 des ersten Chips wurde zugleich mit der Messung des zweiten Chips begonnen. Hierfür wurde der erste Chip direkt nach der Messung ausgebaut, gründlich mit H_2O abgespült und der zweite Chip in die Durchflusszelle integriert. So behandelt zeigte der erste Chip bei der nächsten Messung eine wesentlich höhere Ansprechrate. Bei der Suche nach dem Grund wurde der Fehler in der Reinigungsprozedur gefunden. Für die ersten Messungen des zweiten Chip kam dies aber zu spät, da er in der Zwischenzeit schon mehrere Male vermessen und unter angelegtem Potential gespült worden war, wodurch er ebenfalls auf eine niedrige Ansprechrate fiel. Nachdem nun beide Chips direkt nach der Messung ausgebaut, mit Wasser abgespült und trocken unter Lichtschutz gelagert wurden, wurde eine konstant hohe Ansprechrate beider Chips auf Cyanid beobachtet.

Unter Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung der Messungen der einzelnen Chips wird deutlich, dass beide Kurven auch nach Anwendung der verbesserten Reinigungsprozedur die gleiche Tendenz zeigen. Dies kann durch unterschiedliche effektive NAD^+ -Konzentrationen in der FDH-Kartusche erklärt werden. Die NAD^+ -Lösung wurde stets so hergestellt, dass eine Konzentration von genau 1,0 mM entstand. Wie

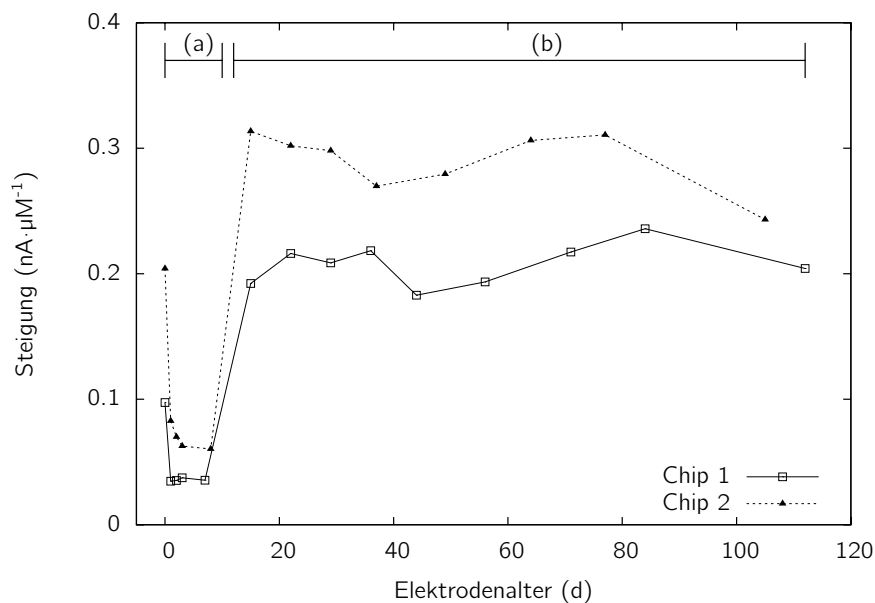


Abbildung 3.43: Lagerstabilität zweier Elektrodenchips. Reinigungsprozedur vor Messung: (a) Chip mit angelegtem Potential in Flusszelle, (b) Chip sofort nach Messung aus Flusszelle entnommen.

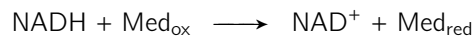
aber bereits in Kapitel 2.13.1 erläutert, sind Fluktuationen der Flussrate von Messung zu Messung unter Verwendung von Schlauchpumpen nur schwer zu vermeiden. Dies bedeutet im Hinblick auf den hier vorliegenden Sensor, dass aufgrund von unterschiedlichen Flussraten von Hauptstrom und NAD⁺-Zufluss unterschiedliche effektive NAD⁺-Konzentrationen im System vorlagen. Zudem könnten Schwankungen in der Raumtemperatur an verschiedenen Tagen die Umsatzrate der Enzyme beeinflusst haben. Eine Kalibration zu Beginn jeder Messung ist daher notwendig. Ungeachtet dessen zeigte sich eine Lagerstabilität des enzymatischen Sensors von mindestens drei Monaten.

3.5 Gassensor

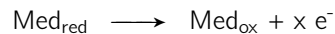
3.5.1 Vorwort

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 besprochen, sind in der Literatur etliche Methoden beschrieben, um die Probleme bei der amperometrischen Bestimmung von NADH zu lösen. Die beiden Hauptprobleme zeigten sich auch bei dem in Kapitel 3.4 vorgestellten Durchflusssensor, der auf der direkten Bestimmung von NADH mittels Amperometrie beruht: Zum einen ist ein relativ hohes Arbeitspotential von in diesem Falle 0,8 V notwendig, da NADH an Graphitelektroden eine hohe Überspannung aufweist. Bei einem so hohen Potential werden neben dem Analyten auch andere Stoffe oxidiert. Dadurch verliert die Bestimmung ihre Selektivität, was auch beim Durchflusssensor beobachtet werden konnte, aber durch doppelte Vermessung der Probe gelöst wurde (Kapitel 3.4.10). Zum anderen zeigt die direkte Detektion von NADH an Elektroden eine mit fortschreitender Messdauer fallende Sensitivität, was durch der elektrochemischen Oxidation nachgelagerte Reaktionen, deren Produkte die Elektrodenoberfläche blockieren, erklärt wird. Auch dieses Phänomen konnte mit je nach Messung unterschiedlicher Intensität beim Durchflusssensor beobachtet werden.

Beim folgenden Ansatz wurde versucht, diese beiden Probleme zu umgehen, indem NADH nicht mehr direkt bestimmt wurde. Vielmehr wurde ein Mediator zugegeben, der die Elektronen des aus der bereits bekannten Enzymkaskade entstandenen NADH aufnahm und somit reduziert wurde:



Amperometrisch bestimmt wurde nun die reduzierte Form des Mediators, die an der WE unter Stromfluss wieder in die oxidierte Form überführt wurde:



Des Weiteren traf die zu untersuchende Lösung nicht mehr direkt auf die Elektrode, sondern wurde in einem abgeschlossenen Behältnis in eine kleine Säuremenge gegeben. Die verwendeten Aufbauten sind in Kapitel 2.13.2 beschrieben. In der Säure wurde Cyanid protoniert, trat als Blausäure in die Gasphase über und gelangte so zur Elektrode. Diese war mit einer Mischung bedeckt, in der sich die Enzyme, NAD⁺ und der Mediator befanden. Somit wurde erwartet, dass dieser Ansatz die Vorteile der Cyanidabtrennung der DIN-Methode (siehe Kapitel 2.12.2) mit denen des zuvor besprochenen enzymatischen Durchflusssensor vereinigt. Durch den direkten Kontakt der biologischen Komponenten mit der Elektrode handelte es sich nun um einen echten Biosensor, der zudem die Probleme der direkten NADH-Detektion mittels Mediator zu lösen versuchte.

Die genaue Zusammensetzung der jeweils verwendeten Mischung zusammen mit den Parametern Typ des Chips, Volumen der Mischung auf dem Chip, angelegtes Potential der amperometrischen Messung, Volumen des Gasraums, Volumen und Typ der

Säurekomponente sowie Angaben über eventuelle Temperierung und Durchmischung des Gasraums sind für die verschiedenen Messungen in Tabelle 3.14 beschrieben und werden mit einer Zahl in einem Kreis referenziert. Die Legenden jeder Abbildung eines Sensogramms enthalten solch eine Referenz, so dass die genauen Bedingungen für jede Messung dokumentiert sind. Wichtige Änderungen der Parameter im Vergleich zu vorhergehenden Messungen sind zusätzlich im Text und/oder der Legende vermerkt. Die Menge an Cyanidase in der Mischung ist als Aktivität in der Einheit $\text{nkatal} \cdot \text{mL}^{-1}$ angegeben. Da es zu aufwändig gewesen wäre, die Aktivität an jedem Messtag zu bestimmen, wurde die Aktivität der jeweils verwendeten, aufgereinigten Cyanidase-Lösung zu meist zwei Zeitpunkten bestimmt und mittels exponentieller Regression intrapoliert. Die Angabe „H₂SO₄“ als Säure bezieht sich stets auf H₂SO₄ dil. 0,2 N.

3.5.2 Henry-Konstante

Vor den eigentlichen Biosensor-Experimenten sollte untersucht werden, wie hoch der Anteil des in der Säure protonierten Cyanids ist, der als Blausäure in die Gasphase übergeht. Nach dem Gesetz von Henry besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration (c in $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) eines gasförmigen Stoffes in einer flüssigen Phase und dem Partialdruck (p in Pa) des Stoffes im Gasraum über der flüssigen Phase. Die Proportionalitätskonstante (H in $\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) wird Henry-Konstante genannt. In der Literatur werden verschiedene Formen des Gesetzes verwendet. Ebenso werden Henry-Konstanten in den verschiedensten Einheiten angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wird von SI-Einheiten und der folgenden Gleichung ausgegangen:

$$p = H \cdot c$$

Werte der Henry-Konstanten von Blausäure im Bereich von 7,4 bis 13,5 $\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ sind bereits beschrieben [San99, Kav04]. Dennoch sollte die Henry-Konstante für die hier vorliegenden Bedingungen experimentell ermittelt werden. Mit der in Kapitel 2.15 beschriebenen Methode wurden so die in Tabelle 3.12 aufgeführten Werte für verschiedene Säuremischungen erhalten. Soweit Standardabweichungen angegeben sind, wurde die Methode dreimal durchgeführt, ansonsten nur einmal. Die Rührzeit betrug dabei 30 min, falls nicht anders angegeben.

Tabelle 3.12: Ermittelte Henry-Konstanten bei verschiedenen Säuremischungen.

Säuremischung	H ($\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	
H ₂ SO ₄ dil. 0,2 N (60 min)	15,19	±4,0 %
H ₂ SO ₄ dil. 0,2 N	20,72	±6,1 %
H ₂ SO ₄ dil. 0,2 N + Glycerol (1 + 1,03)	15,42	±3,4 %
H ₃ PO ₄ 1 M	7,74	±1,7 %
H ₃ PO ₄ 1 M + Glycerol (1 + 1,03)	21,27	

3.5.3 Möglicher Potentialbereich von Cyanidase und FDH

Da bei dem für den Gassensor gewählten Aufbau beide Enzyme in direkten Kontakt mit der WE treten können, ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Potentialbereiche den Enzymen Schaden in Form von Oxidation oder Reduktion zufügen. Um abschätzen zu können, welche Potentialbereiche gefahrlos nutzbar sind, wurden mit den beiden Kohlenstoff-Elektrodentypen W4 und W5 cyclische Voltammogramme von Cyanidase und FDH aufgenommen, die in Abbildung 3.44 dargestellt sind. Es sind jeweils im Vergleich zu Puffer keine deutlichen Peaks zu erkennen. Lediglich Cyanidase zeigte bei Typ W4 einen sehr schwachen kathodischen Peak (bei ca. 0 V, Rücklauf von +1,0 V zu -0,5 V, niedrigerer Strombereich). Der anodische Peak, der vor allem mit Puffer beim Typ W4 auftrat (deutlicher Zacken zum positiven Strombereich bei ca. 0,06 V), ist höchstwahrscheinlich auf Oberflächeneigenschaften der Elektrode zurückzuführen und hat keinen Bezug zu den Enzymen.

In diesen Versuchen konnte somit keine offensichtliche elektrochemische Reaktion der Enzyme in dem gewählten Potentialbereich von -0,5 bis 1,0 V gefunden werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Konzentration der Cyanidase mit ungefähr 0,1 mM relativ niedrig war. Die Konzentration der FDH wurde nicht bestimmt, es handelte sich um die von JFC erhaltene, unverdünnte Lösung mit $224 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.5.4 Erweiterung des Formiat-Sensors von Sandström

Das Prinzip eines von Sandström et al. [SNS⁺00, SCS⁺01, SSLT03] demonstrierten Sensors für Ameisensäure in der Gasphase wurde um das Enzym Cyanidase erweitert, so dass die bereits bekannte Kaskade von Cyanid über Formiat zu NADH um den Mediator MB ergänzt wurde. Dies wurde realisiert, indem eine Mischung aus 160 μL Glycerol, 40 μL FPLC-Auftragepuffer pH 7,0, 20 μL einer NAD⁺-Lösung (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in FPLC-Auftragepuffer pH 7,0), 10 μL einer Meldolablauf-Lösung (20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in FPLC-Auftragepuffer pH 7,0), 20 μL FDH-Lösung und 50 μL Cyanidase-Lösung hergestellt wurde. 10 μL dieser Mischung (Tabelle 3.14: ①) wurden so auf einen Elektrodenchip aufgebracht, dass ein alle Elektroden bedeckender, gleichmäßiger Film entstand (Abbildung 3.45). Eine zuvor durchgeführte Aufnahme eines cyclischen Voltammogramms (Abbildung 3.46) zeigte einen anodischen Peak bei -0,023 V. Nach Einberechnen eines Sicherheitsabstands wurde für amperometrische Messungen ein Potential von 0,1 V ausgewählt.

Unter Verwendung von Aufbau A in Abbildung 2.9 (Seite 67) mit 1,9 mL H₂SO₄ dil. wurden bei mehreren Messungen mit Zugaben von Cyanid-Lösung die in Abbildung 3.47 wiedergegebenen Sensogramme erhalten. Die Artefakte bei den Zugaben stammen von Vibrationen des Aufbaus aufgrund mangelnder Erfahrung bei der Handhabung.

Um analog zum Beweis des Prinzips des Durchflusssensors (Kapitel 3.4.5) die angenommene Theorie dieses Ansatzes zu verifizieren, wurden Mischungen hergestellt, bei denen jeweils eine der Komponenten Cyanidase, FDH, NAD⁺ und MB weggelassen

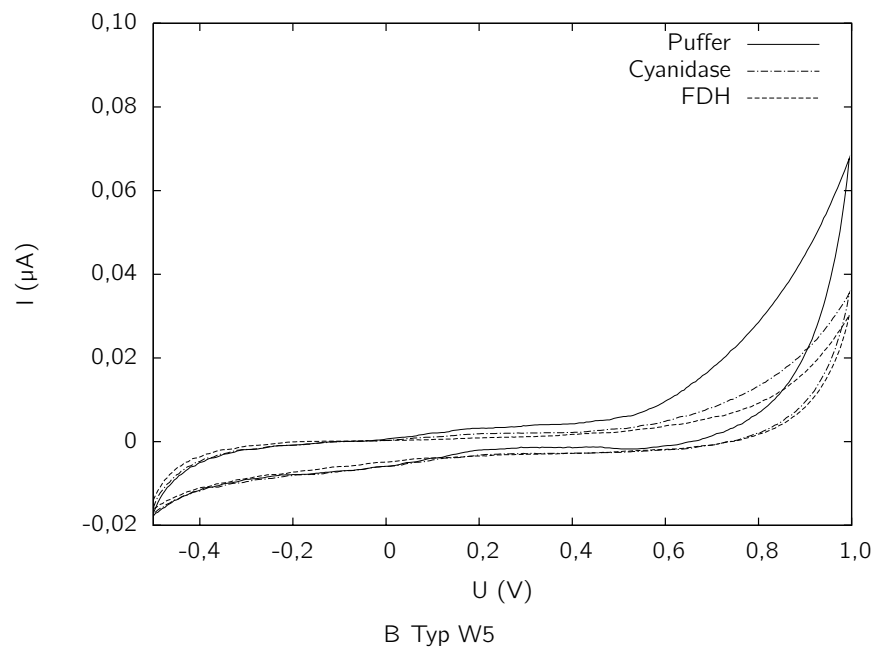
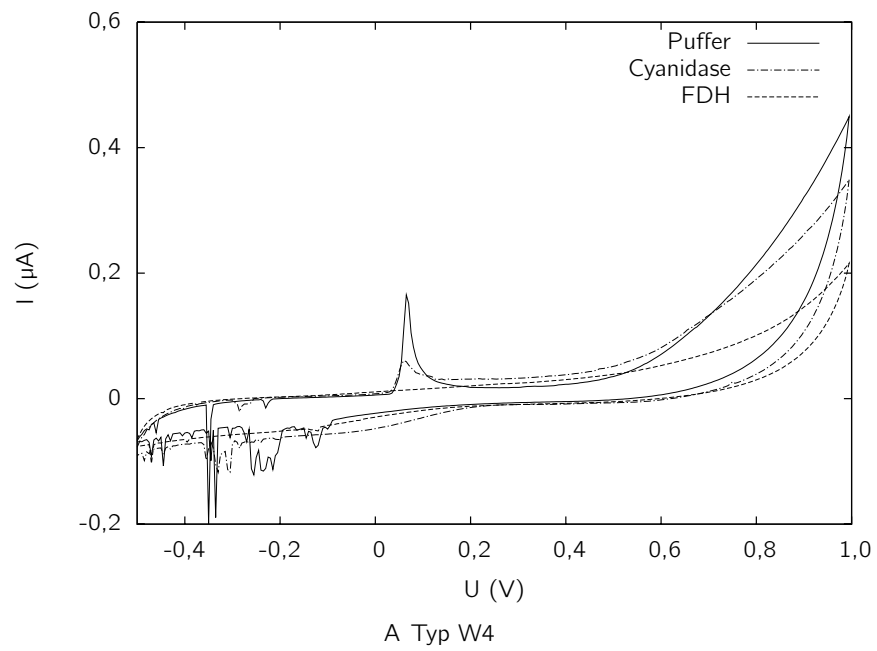


Abbildung 3.44: CV mit Cyanidase und FDH im Vergleich zu FPLC-Lösepuffer pH 7,0, Scanrate 0,1 V·s⁻¹

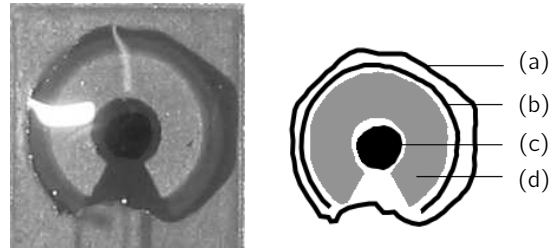


Abbildung 3.45: Kopf eines mit Mischung bedeckten Elektrodenchips (Typ W5). (a) Rand des Mischungstropfens, (b) AE, (c) WE, (d) RE.

wurde. Unter gleichen Bedingungen wie zuvor wurde die Reaktion auf Cyanidzugaben untersucht. Abbildung 3.48 zeigt sämtliche Experimente dieses Typs. Aufgetragen ist ein Messbereich von $-0,2$ bis $0,2$ nA, wobei bei keiner Zugabe eine sichtbare Stromerhöhung auftrat. Verglichen mit dem Signal in Abbildung 3.47, das Höhen von $0,5$ bis 3 nA erreichte, wird ersichtlich, dass mit keinem Kontrollansatz eine Reaktion auf Cyanid erhalten wurde.

In einem weiteren Experiment, wieder mit vollständiger Mischung, wurde als Vorversuch zur Bestimmung der Nachweisgrenze untersucht, wie der Sensor auf eine sehr geringe Menge an Cyanid reagiert. Dazu wurden 1 nmol Cyanid in 25 μL NaOH 30 mM zugegeben. Nachdem sich nur ein sehr schwaches Signal zeigte (Vergrößerung

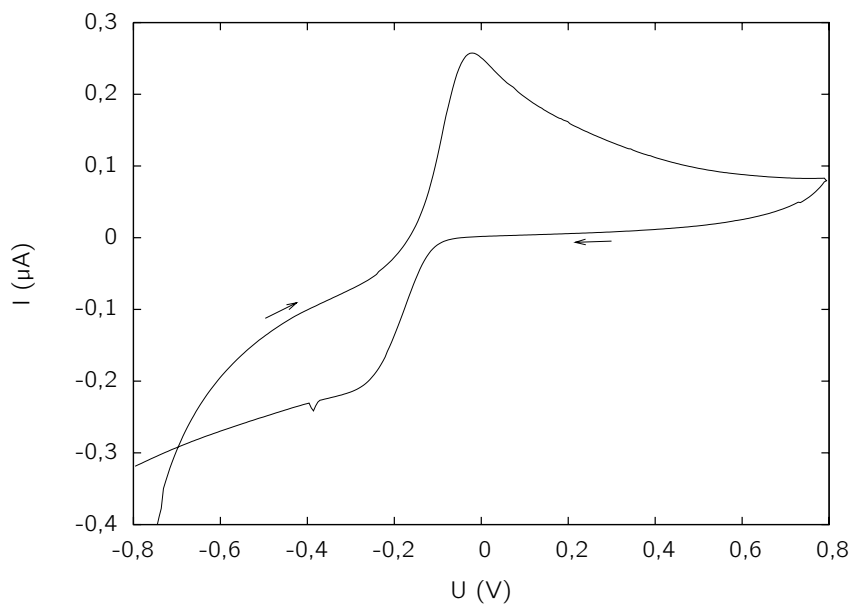


Abbildung 3.46: CV mit MB-haltiger Lösung auf Typ W5. Scanrate $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$

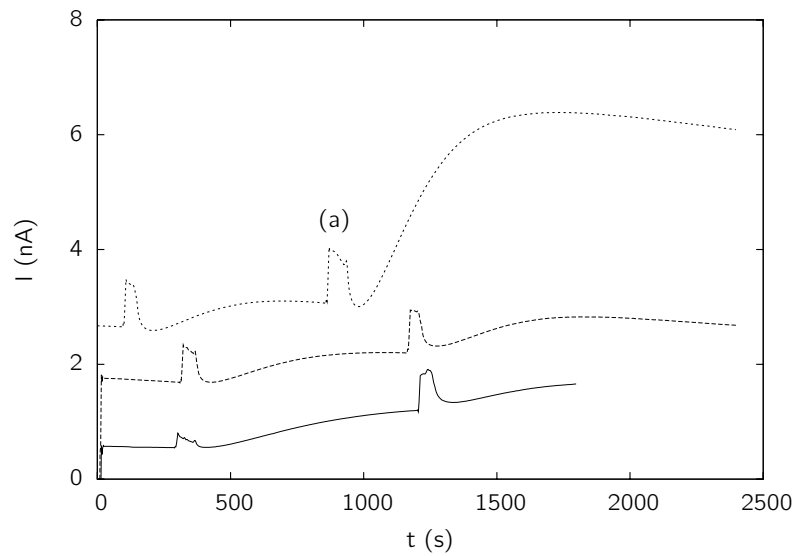


Abbildung 3.47: Gasphasenmessung, Bedingungen ①, Potential 0,1 V. Pro Stufe Zugabe von 10 μL Cyanid-Lsg. 1,5 mM (15 nmol) außer bei (a), hier 50 μL (75 nmol).

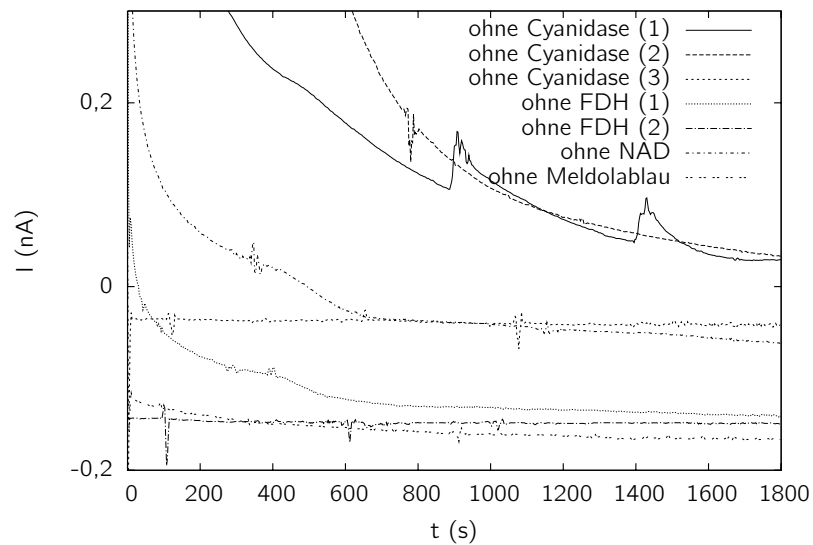


Abbildung 3.48: Kontrollexperimente, Bedingungen ②, Potential 0,1 V. Zugaben von 30 μL Cyanid-Lsg. 1,5 mM (ca. 45 nmol) zu verschiedenen Zeiten außer bei erster Messung ohne Cyanidase („ohne Cyanidase (1)“), hier 50 μL (75 nmol) und 150 μL (225 nmol).

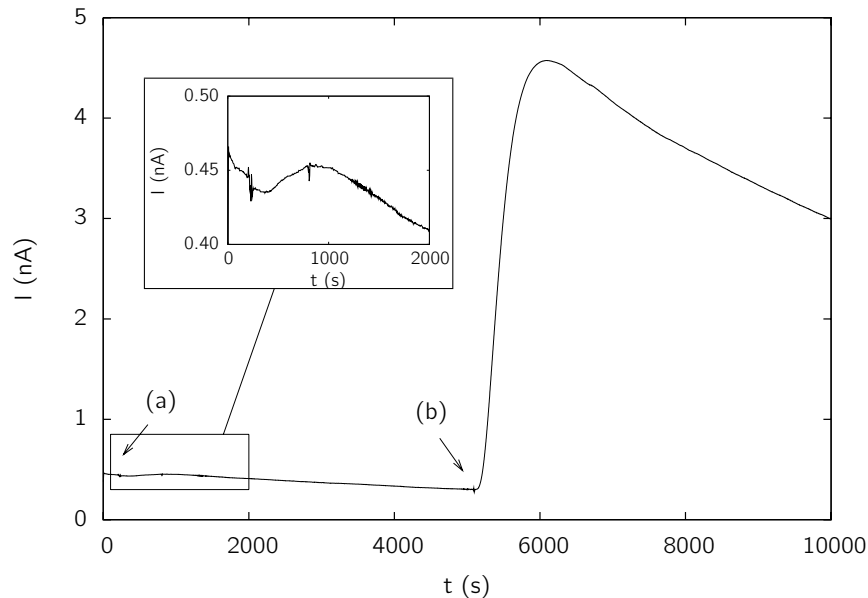


Abbildung 3.49: Reaktion auf unterschiedliche Cyanid-Mengen bei nahezu gleicher Volumenänderung, Bedingungen ②, Potential 0,1 V. Zugabe von (a) 1 nmol Cyanid in 25 μL , (b) 45 nmol in 30 μL .

in Abbildung 3.49), wurde eine erheblich größere Menge (45 nmol) Cyanid zugegeben, wobei das zugegebene Volumen aber nahezu konstant gehalten wurde (25 gegenüber 30 μL). Dabei zeigte sich wie erwartet ein hohes Signal. Allerdings blieb die Stromstärke nicht konstant auf dem höheren Niveau, sondern fiel relativ schnell wieder ab.

Da 10 μL Mischung im Vergleich zur Fläche der Elektroden auf dem Chip ein relativ großes Volumen darstellen, wurde versucht, das Volumen deutlich zu verringern. Durch den Einsatz von 2 μL Mischung auf dem Chip wurde das Sensogramm in Abbildung 3.50 erhalten. Im Vergleich zu Abbildung 3.49 fiel hier das Signal nach Erreichen der Stufe nicht in höherem Maße ab als die Basislinie.

Mit den Ergebnissen der Bestimmung der Henry-Konstanten (Kapitel 3.5.2) konnte berechnet werden, wie viel Prozent des eingesetzten Cyanids in die Gasphase übergeht, sofern der Übertritt von Cyanid in die Mischung sowie die darin stattfindenden Folgereaktionen vernachlässigt werden. Bei einer Gasphase von 27 mL und einem Flüssigkeitsvolumen von 1,9 mL wären dies zwischen 4,2 und 10,9 %. Bei einer Verringerung des Flüssigkeitsvolumens auf 0,16 mL (Gasphase dann 28,7 mL), würden dagegen 35,9 bis 60,6 % des eingesetzten Cyanids in die Gasphase gelangen. Ein Versuch, bei dem während der Messung das zunächst verwendete Rollrandglas mit 1,9 mL verdünnter Schwefelsäure gegen ein frisches mit wesentlich weniger Säure ausgetauscht wurde, sollte zeigen, ob die Sensorantwort bei Cyanidzugaben dies bestätigt. Abbildung 3.51 enthält das Sensogramm dieses Versuchs. Während bei einem

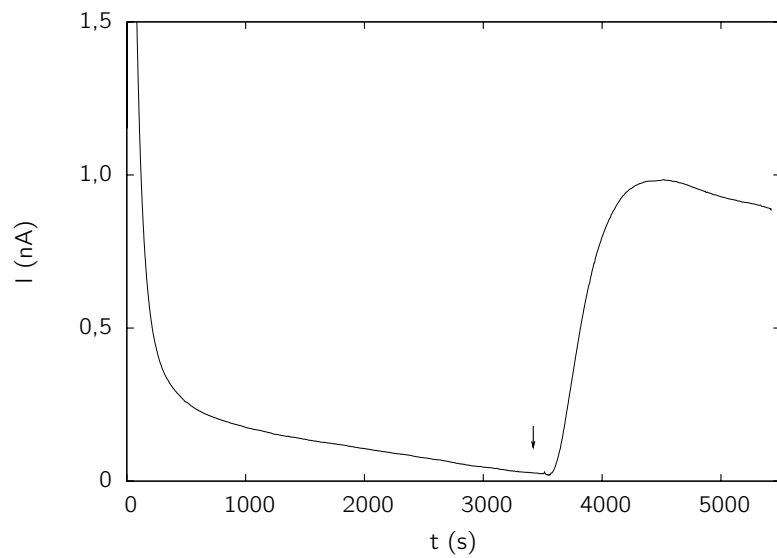


Abbildung 3.50: Geringes Volumen Mischung (2 μL) auf Elektrode, Bedingungen ③, Potential 0,1 V. Pfeil: Zugabe von 8 nmol CN^- in 20 μL .

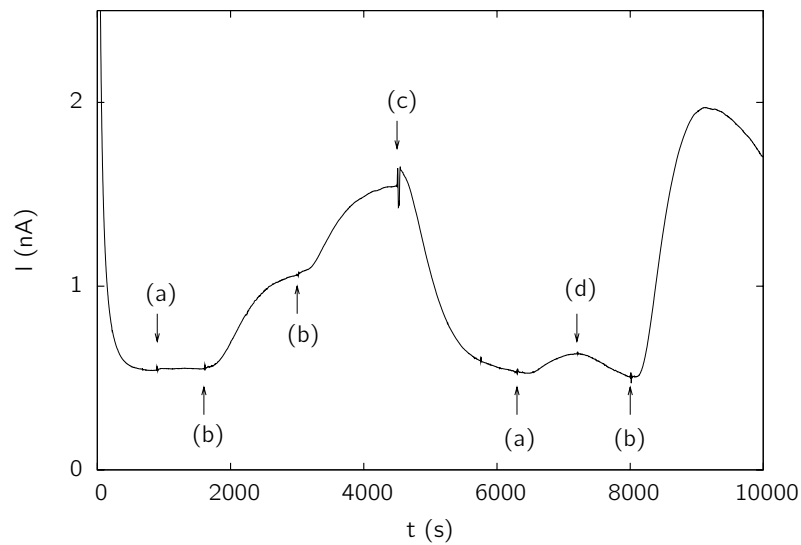


Abbildung 3.51: Verschiedene Volumina von H_2SO_4 dil. in Rollrandglas, Start mit 1,9 mL, Bedingungen ④, Potential 0,1 V. (a) Zugabe von 1 nmol Cyanid in 25 μL , (b) Zugabe von 10 nmol Cyanid in 25 μL , (c) Umsetzen auf frisches Rollrandglas mit 0,16 mL H_2SO_4 dil., (d) Zugabe von 240 μL H_2SO_4 dil.

Tabelle 3.13: Vergleich von Signalhöhen bei verschiedenen Säurevolumina im gleichen Gefäß

n(Cyanid) (nmol)	Signalhöhe (nA) bei		
	0,16 mL	0,4 mL	1,9 mL
1	0,105		0,01
10		1,47	0,50

Säurevolumen von 1,9 mL eine Zugabe von 1 nmol Cyanid nur ein minimales Signal in Form einer Stromerhöhung von ca. 0,01 nA bewirkte, stieg das Signal bei einem Säurevolumen von 0,16 mL und einer Zugabe von 1 nmol Cyanid auf ca. das Zehnfache (0,105 nA ohne Berücksichtigung der abfallenden Basislinie). Die Zugabe von 10 nmol Cyanid bewirkte bei einem Säurevolumen von 1,9 mL eine Stromerhöhung von 0,47 bzw. 0,53 nA, wohingegen bei einem Säurevolumen von 0,4 mL eine Erhöhung auf ungefähr das Dreifache, nämlich 1,47 nA, beobachtet wurde (Tabelle 3.13). Es ist allerdings zu bemerken, dass das Signal nach Zugabe in das kleinere Volumen keine Stufe erreichte, sondern nach Ausbildung eines Maximums wieder abfiel. Vor der letzten Zugabe von 10 nmol Cyanid war das Säurevolumen von 0,16 mL, das noch bei Zugabe von 1 nmol Cyanid vorlag, auf 0,4 mL erhöht worden, da es sich als sehr schwierig erwies, bei einer Zugabe in ein so kleines Volumen die Säure überhaupt zu treffen.

Um das höhere Signal bei einem veränderten Verhältnis von Säure- und Gasraumvolumen auszunutzen, wurden nun statt Rollrandgläsern wesentlich größere Dreihalskolben mit einem Volumen von ca. 500 mL verwendet. Abbildung 2.9C gibt schematisch den Aufbau wieder. Auf dem Boden des Kolbens befand sich ein Säurevolumen von 1 mL. Mit diesem Aufbau sollten 61 bis 81 % des zugegebenen Cyanids in die Gasphase übergehen. Zudem wurde ein Mischungsvolumen von 2 statt wie bisher meist 10 μ L auf den Elektrodenchip aufgebracht. Unter diesen Bedingungen konnte bei zwei Messungen, einmal mit verdünnter Schwefelsäure und einmal mit einer Mischung aus verdünnter Schwefelsäure und Glycerol als Säurekomponente, eine deutliche, relativ gleichmäßige Stufenbildung bei wiederholter Zugabe von Cyanid beobachtet werden, (Abbildungen 3.52 und 3.53). Die Zumischung von Glycerol zur Säure wurde vorgenommen, da beobachtet worden war, dass bei der Messung ohne Glycerol in der Säurekomponente das Mischungsvolumen auf dem Chip nach der Messung stark angestiegen war. Da der Grund hierfür höchstwahrscheinlich der im Vergleich zur Schwefelsäure geringere Wasserdampfdruck der Mischung war, wurde mit dieser Maßnahme versucht, den Wasserdampfdruck der Säure zu verringern. Tatsächlich konnte die Volumenzunahme der Mischung damit verringert werden.

Diese gleichmäßigen Stufen konnten allerdings bei weiteren Messungen nicht reproduziert werden. Nach einer gewissen Zeit driftete das Signal entweder zu höheren oder zu niedrigeren Stromstärken, anstatt konstant auf einer Stufe zu verharren. Ein Einfluss auf die Richtung dieses Drifts schien die Stellung des Elektrodenchips und

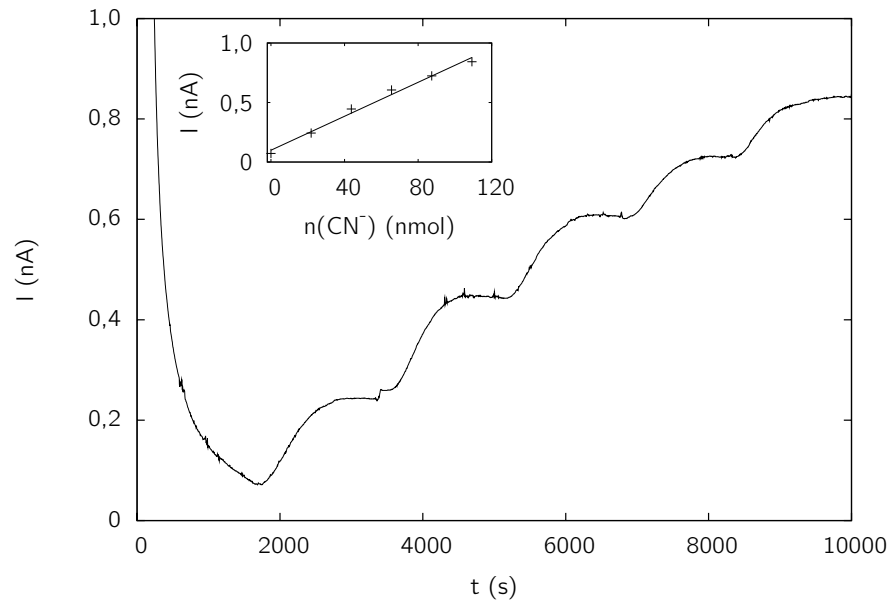


Abbildung 3.52: Messung in 500 mL-Dreihalskolben, Säurekomponente H_2SO_4 dil., Bedingungen ⑤, Potential 0,1 V. Additive Zugaben von Cyanid, jeweils ca. 22 nmol pro Stufe.

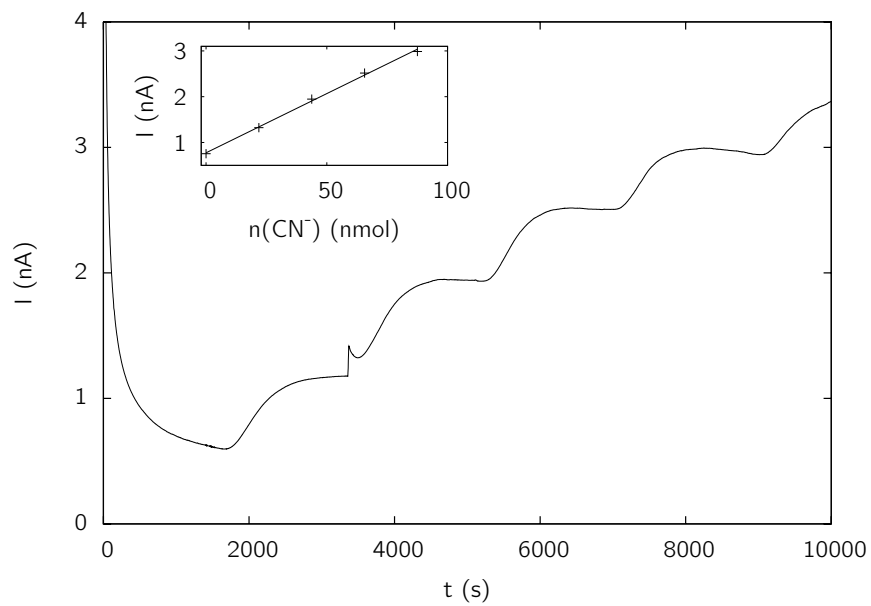


Abbildung 3.53: Messung in 500 mL-Dreihalskolben mit einer Mischung von Glycerol und H_2SO_4 (775 + 800), Bedingungen ⑥, Potential 0,1 V. Additive Zugaben von Cyanid, jeweils ca. 22 nmol pro Stufe.

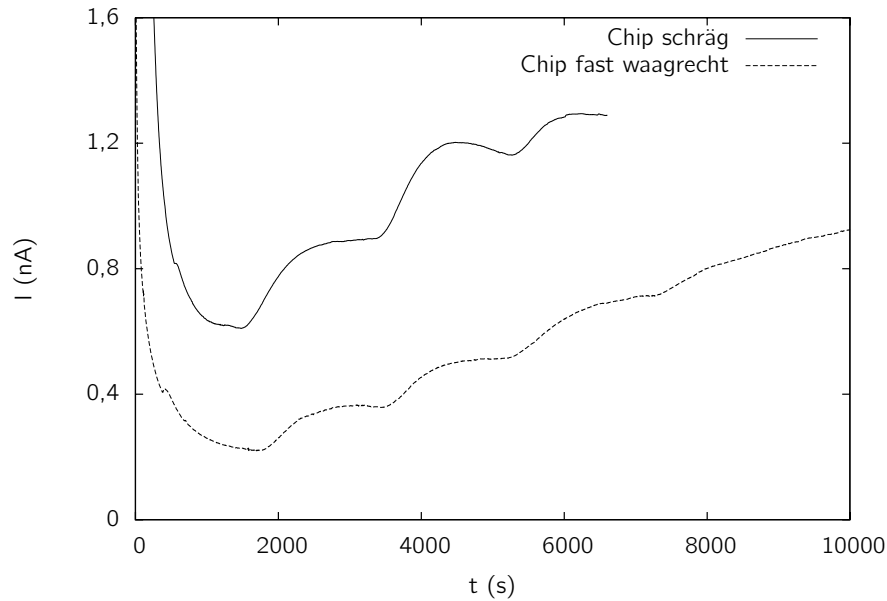


Abbildung 3.54: Stellung des Elektrodenchips, Bedingungen ⑤, Potential 0,1 V. Additive Zugaben von Cyanid, jeweils ca. 22 nmol pro Stufe.

somit die Form der aufgebrachten Mischung zu haben. Bei waagrechter Stellung des Chips war die Mischung gleichmäßig über die Elektroden verteilt, was einen Drift zu höheren Stromstärken zur Folge hatte. Bei schrägem Chip formte sich die Mischung zu einem herabhängenden Tropfen, wodurch die WE nur minimal von der Mischung bedeckt war. Hier sank die Stromstärke nach Erreichen einer Stufe ab. Beides zeigt sich beispielhaft bei den in Abbildung 3.54 wiedergegebenen Messungen. In den folgenden Kapiteln werden nun Methoden untersucht, die auf die Verteilung der Mischung auf dem Chip Einfluss nehmen.

3.5.5 Fixierung der Mischung mit Papier

Um die Mischung auf dem Chip zu fixieren, wurde ein Rechteck aus einem Zigarettenpapier (GIZEH fine extra slim) ausgeschnitten. Die Größe dieses Rechtecks war so gewählt, dass alle Elektroden bedeckt wurden, das Papier aber nicht über den Chip hinausragte. Das Papier wurde auf den Chip gelegt und 2 μL Mischung langsam auf eine Ecke pipettiert, so dass sich das Papier mit der Mischung vollsaugen konnte. Eine Messung in der Gasphase nach bekanntem Schema ergab das in Abbildung 3.55 gezeigte Sensogramm. Der gewünschte Erfolg in Form von konstanten Stufen stellte sich nicht ein, das Signal fiel nach Erreichen eines Maximums als Reaktion auf Zugaben wieder ab. Zudem fiel die Ansprechzeit des Sensors auf Zugaben

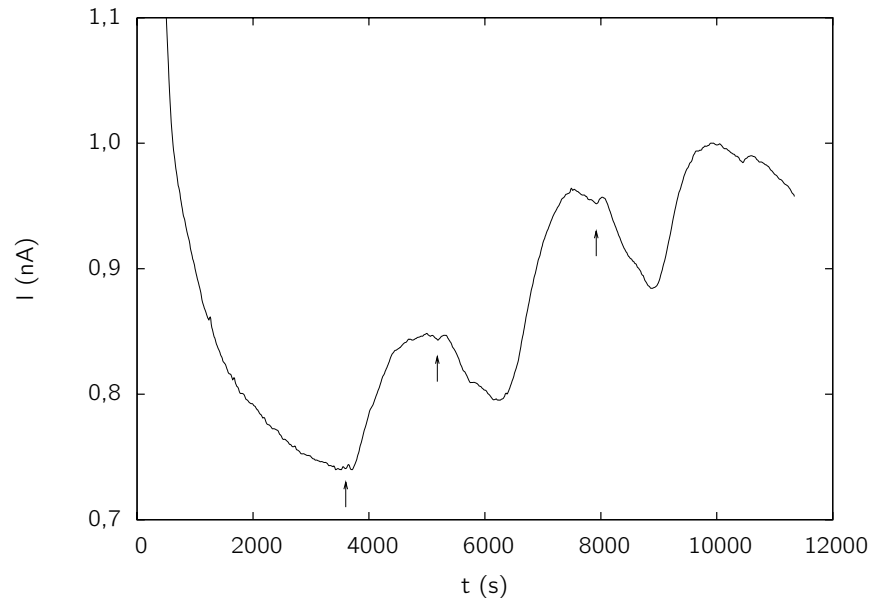


Abbildung 3.55: Mischung auf Zigarettenpapier, Bedingungen ⑦, Potential 0,1 V. Zugabe von 7,5 nmol Cyanid pro Pfeil.

äußerst unterschiedlich aus, was an den Zeitspannen zwischen den Pfeilen und dem Stufenanstieg im Sensogramm zu erkennen ist.

Bei einem direkten Vergleich zwischen jeweils drei Elektrodenchips mit und ohne Papier wurden deutlich bessere Signale auf Cyanidzugaben bei Chips ohne Papier erhalten. Abbildung 3.56 zeigt beispielhaft je ein Sensogramm. Nach diesen Erfahrungen wurde auf den Einsatz von Zigarettenpapier verzichtet.

3.5.6 Luftdurchfluss

Eine weitere Möglichkeit, die Position der Mischung auf dem Chip zu beeinflussen, wurde bereits von Sandström et al. [SNS⁺00] ausgenutzt, indem eine Membran über Mischung und Chip platziert wurde. Da die von Sandström et al. hierfür verwendete Methode (Fixieren der Membranränder mittels Klebstoffs) technisch nur schwer realisierbar erschien, wurde die Fixierung mit Hilfe einer Durchflussszelle vorgenommen. Nach Pipettieren von Mischung auf einen Elektrodenchip wurde ein Stück einer Dialysemembran (MWCO 12 000–14 000), die zuvor mindestens zwei Stunden in einer Mischung aus FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 und Glycerol (1 + 1,07) gequollen war, auf den Chip aufgebracht. Beim Einbau in die Durchflussszelle wurde ein Teil der Mischung auf dem Chip seitlich herausgedrückt, so dass das in Tabelle 3.14 angegebene Volumen der Mischung auf dem Chip nur dem ursprünglich aufpipettierten Volumen entspricht. Die Flusszelle der Firma BST erschien für dieses Experiment geeigneter, daher wurde

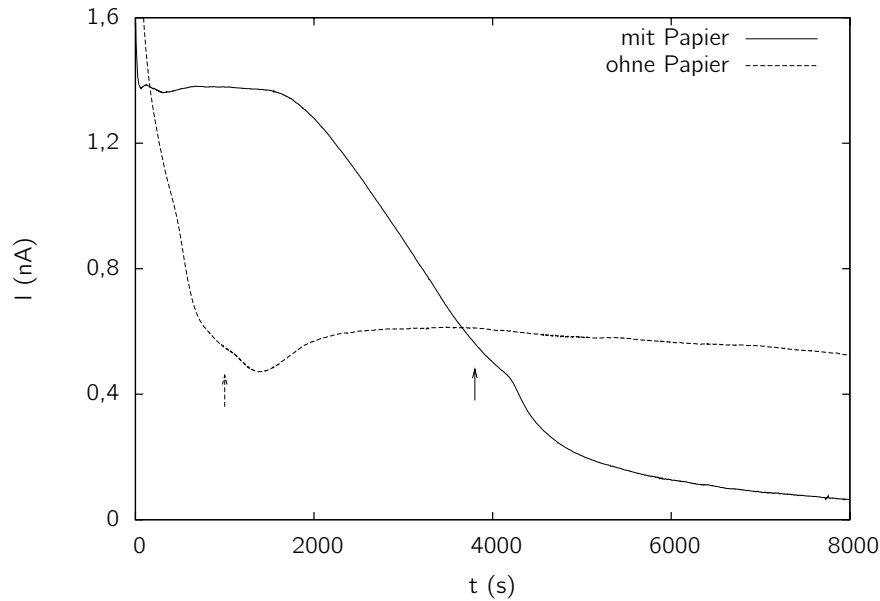


Abbildung 3.56: Vergleich mit und ohne Zigarettenpapier, Bedingungen ⑧, Potential 0,1 V. Zugabe von 55 nmol Cyanid pro Pfeil.

diese zusammen mit Elektrodenchips vom Typ BST/C verwendet. Die Flusszelle wurde mit Luft bei einer Flussrate von $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ betrieben. In einem Rollrandglas (ca. 27 mL Gasraum, 1 mL Säure) wurde unter Rühren eine blausäurehaltige Atmosphäre erzeugt. Der Deckel des Rollrandglases war mit zwei verschließbaren Öffnungen versehen worden. Eine davon diente als Anschlussmöglichkeit für das Saugende des Pumpenschlauchs, die andere zur Luftzufuhr. Nach Anschluss des Pumpenschlauchs wurde somit blausäurehaltige Luft am Elektrodenchip vorbeigeleitet. Teilweise wurde die Abluft wieder in das Rollrandglas zurückgeleitet, in der die Atmosphäre erzeugt worden war, um ein längerfristigeres Einwirken von Blausäure auf den Sensor zu erreichen. Dies ist in der Legende des Sensogramms vermerkt.

Wie die Sensogramme in den Abbildungen 3.57 und 3.58 zeigen, konnten Signale in Form von Peaks erhalten werden. Peakhöhen von 0,077 (Abbildung 3.57) bzw. 0,164 nA (Abbildung 3.58) bei einer Cyanid-Menge von 600 nmol waren jedoch nicht zufriedenstellend angesichts der Tatsache, dass eine Zugabe von 75 nmol Cyanid bei der in Abbildung 3.47 dargestellten Messung eine Erhöhung des Stroms um 3,38 nA bewirkt hatte. Der Unterschied entspricht einem Faktor von 351 bzw. 164. Die Ansprechrate konnte auch nicht durch Aufrechterhalten der blausäurehaltigen Atmosphäre verbessert werden (Abbildung 3.57). Zudem war das Signal nicht reproduzierbar, wie der wesentlich niedrigere Peak im Sensogramm in Abbildung 3.58 bei der zweiten Vermessung von 600 nmol Cyanid gegenüber der ersten Vermessung dieser Stoffmenge zeigt. Eine mögliche Ursache für den bei zweiter Vermessung der gleichen

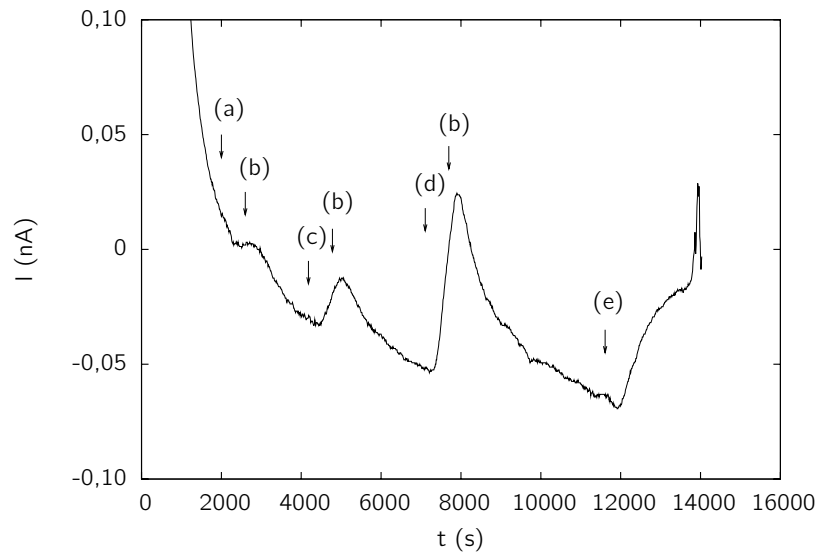


Abbildung 3.57: Elektrodentyp BST/C in Durchflussszelle bei Luftdurchfluss, Bedingungen ⑨, Potential 0,1 V. (a) Ansaugen von 100 nmol HCN, (b) Ende Ansaugen, (c) Ansaugen von 200 nmol HCN, (d) Ansaugen von 600 nmol HCN, (e) Ansaugen von 600 nmol HCN, dabei Abluft in das Blausäure-Gefäß geleitet (im Kreis gepumpt).

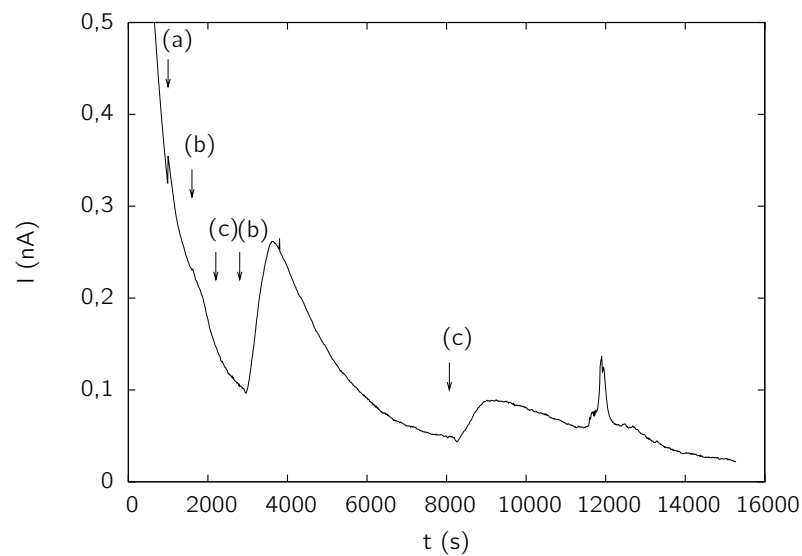


Abbildung 3.58: Elektrodentyp BST/C in Durchflussszelle bei Luftdurchfluss, Bedingungen ⑩, Potential 0,1 V. (a) Ansaugen von 100 nmol HCN, (b) Ende Ansaugen, (c) Ansaugen von 600 nmol HCN.

Cyanidmenge niedrigeren Peak könnte darin bestehen, dass die Dialysemembran trotz Einsatz von Glycerol als Feuchthaltemittel eintrocknete, was zum Ende aller Messungen mit Luftdurchfluss beobachtet worden war. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.5.7 Adsorption von Meldolablauf an Elektroden

Wie vielfach in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 1.2.4), kann durch eine Vorbehandlung der Oberflächen von WE eine deutliche Verbesserung der Eigenschaften bezüglich der Bestimmung von NADH erreicht werden. Die Adsorption von MB als einfache Maßnahme wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurde eine WE eines Elektrodenchips vom Typ W5 nach einer Vorbehandlung über Nacht in Salzsäure (10 %) portionsweise mit insgesamt 0,5 μL einer Lösung von MB in Ethanol (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) betropft. Nach lichtgeschützter Lagerung, wiederum über Nacht, wurde das nicht adsorbierte MB gründlich mit Wasser abgespült.

In einem cyclischen Voltammogramm (Abbildung 3.59) waren keine Peaks sichtbar, die auf eine erfolgreiche Adsorption von MB hinwiesen. Da aber die vorbehandelte Elektrode im Vergleich zu einer nicht vorbehandelten deutlich anders auf NADH reagierte, wurde eine Mischung mit Cyanidase, NADH und FDH, aber ohne MB auf den Chip aufgebracht. Bei einem Potential von 0,1 V zeigte sich zunächst statt dem üblichen Abfall des Stroms bis zum Erreichen einer Basislinie ein ansteigender Strom (Abbildung 3.60). Nach Cyanidzugaben wurden Stufen beobachtet, wobei die Stufe nach der zweiten Zugabe der gleichen Stoffmenge wesentlich niedriger ausfiel. Daraufhin wurde dieser einfache Ansatz nicht weiter verfolgt, sondern stattdessen versucht, MB nach einem elektrochemischen Vorbehandlungsverfahren auf die WE aufzubringen.

3.5.8 Meldolablauf-Adsorption nach elektrochemischer Vorbehandlung

Nachdem die Adsorption von MB auf einer in Salzsäure vorbehandelten Elektrode nicht den gewünschten Erfolg gebracht hatte, wurde die Vorbehandlung um ein elektrochemisches Element erweitert. Die Methode (frei nach Nagy et al. [NKG95]) ist in Kapitel 2.14.2 beschrieben. Die in Abbildung 3.61 dokumentierte Kontrolle des Prozesses durch CV auf den Stufen der fabrikfrischen Elektrode, der Elektrode direkt nach elektrochemischer Vorbehandlung sowie nach Adsorption von MB zeigte eine gute Übereinstimmung mit den von Nagy et al. veröffentlichten Ergebnissen. Dabei floss bei einer frischen, unbehandelten Elektrode im cyclischen Voltammogramm kein nennenswerter Strom, was sich nach der elektrochemischen Vorbehandlung jedoch in großem Maße änderte. Nach Schwenken der Elektrode in einer Lösung von MB waren ein deutlicher anodischer sowie ein kathodischer Peak erkennbar, was darauf schließen lässt, dass eine Adsorption von MB an die Elektrode stattgefunden hatte.

Zudem wurde eine Änderung im Aufbau der amperometrischen Messung vorgenommen. Da vermutet wurde, dass der kleine Rührfisch in der Säure die darüberstehende

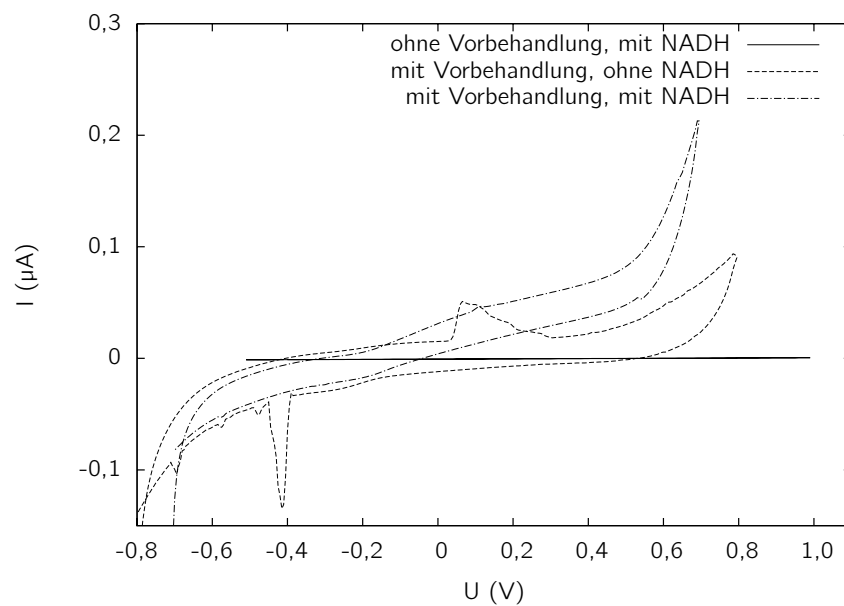


Abbildung 3.59: CV nach Adsorption von MB. Ohne Vorbehandlung: NADH in Puffer, 10 mM. Mit Vorbehandlung: Glycerol / Puffer, teils mit NADH (8 mM).

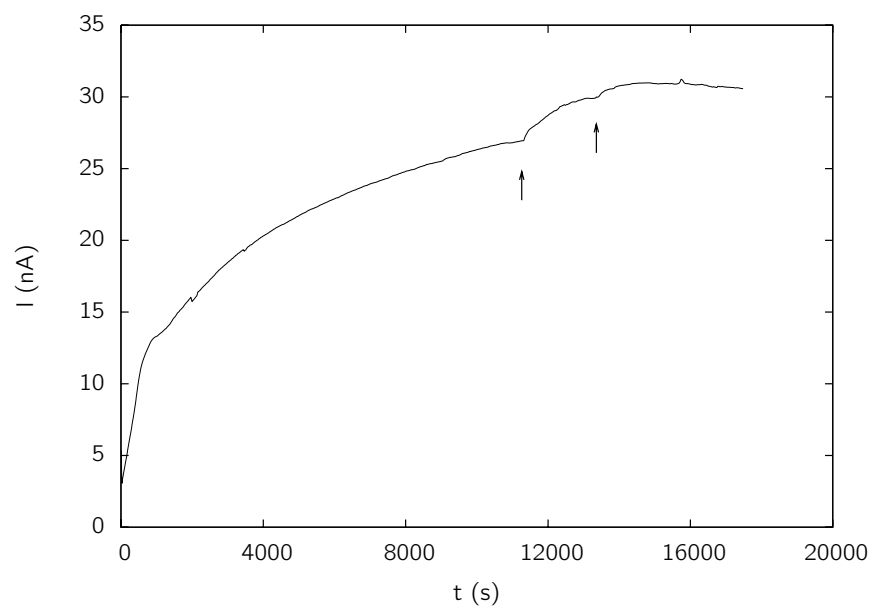


Abbildung 3.60: CME (W5) mittels Adsorption von MB, Bedingungen ⑪, Potential 0,1 V. Pro Pfeil 44 nmol Cyanid.

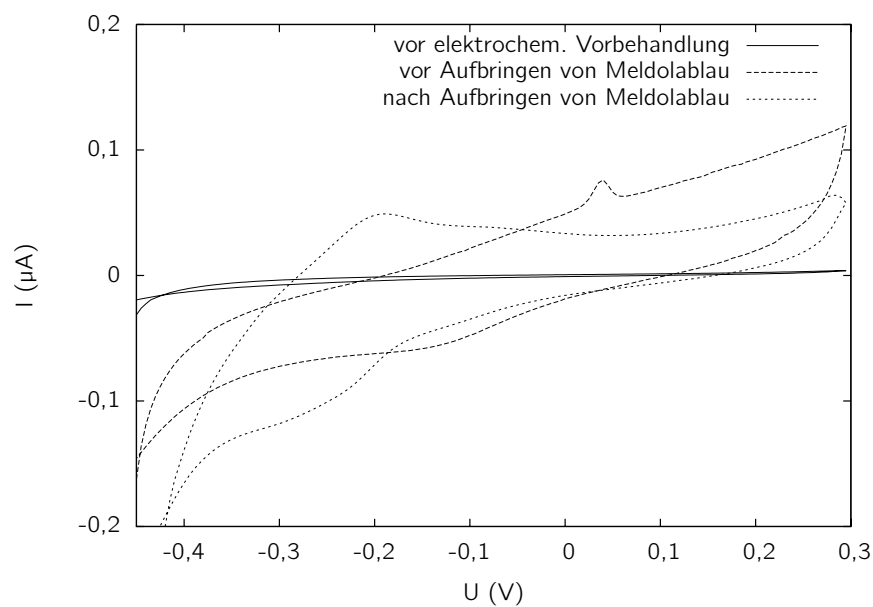


Abbildung 3.61: CME nach Nagy, CV bei unterschiedlichen Stufen der Vorbehandlung.

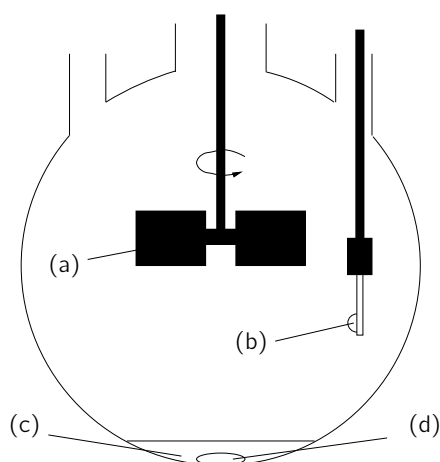


Abbildung 3.62: Aufbau Kolben mit Paddel im Gasraum. (a) Paddel, (b) Mischung auf Elektrodenchip, (c) Säure, (d) Rührfisch.

Luft nur unzureichend in Bewegung setzen kann, wurde ein Rührpaddel in die Gasphase integriert, das eine schnellere Durchmischung der Gasphase gewährleisten sollte. Eine schematische Darstellung dieses Aufbaus ist in Abbildung 3.62 zu finden. Falls nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Experimente bezüglich elektrochemisch vorbehandelter Elektroden mit diesem Paddel durchgeführt. Für erste Messungen wurde eine Mischung mit Cyanidase, FDH und NAD^+ , aber ohne MB auf einen elektrochemisch und mit MB vorbehandelten Chip pipettiert und ein Potential von $-0,2\text{ V}$ eingestellt. Dieses Potential beinhaltet allerdings keine Sicherheitsspanne, da der im cyclischen Voltammogramm beobachtete anodische Peak des MB ebenfalls bei ca. $-0,2\text{ V}$ lag. Wie die in Abbildung 3.63 dargestellten Sensogramme zeigen, war die Basislinie wesentlich unruhiger als bei Elektroden ohne elektrochemische Vorbehandlung, was aber auch durch den Einsatz des oben beschriebenen Paddels verursacht sein könnte. Lediglich bei zwei der drei Messungen mit $-0,2\text{ V}$ wurde bei der jeweils ersten Zugabe von 67 nmol Cyanid eine Sensorantwort in Form einer Stromerhöhung erhalten. Reaktionen auf weitere Zugaben konnten nicht vom Basislinienrauschen unterschieden werden, obwohl teilweise Stoffmengen von 336 nmol Cyanid zugegeben wurden. Die Auswahl dieser hohen Stoffmengen war vorgenommen worden, nachdem Zugaben von kleineren Stoffmengen wie z. B. $6,7\text{ nmol}$ praktisch kein Signal verursachten.

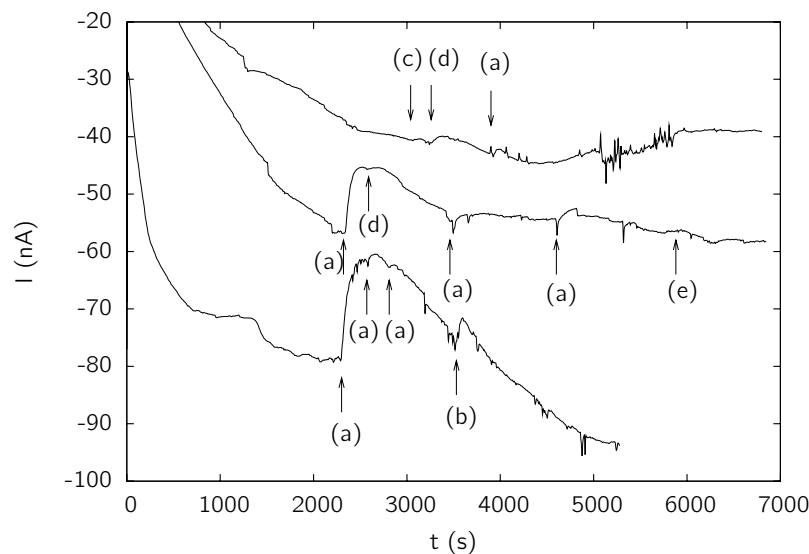


Abbildung 3.63: CME nach Nagy, Messungen bei $-0,2\text{ V}$, Bedingungen ⑫, Potential $-0,2\text{ V}$. Cyanidzugaben von (a) 67 nmol in $60\text{ }\mu\text{L}$, (b) 336 nmol in $30\text{ }\mu\text{L}$, (c) $6,7\text{ nmol}$ in $60\text{ }\mu\text{L}$, (d) 34 nmol in $30\text{ }\mu\text{L}$, (e) Kolben geöffnet und offen gelassen.

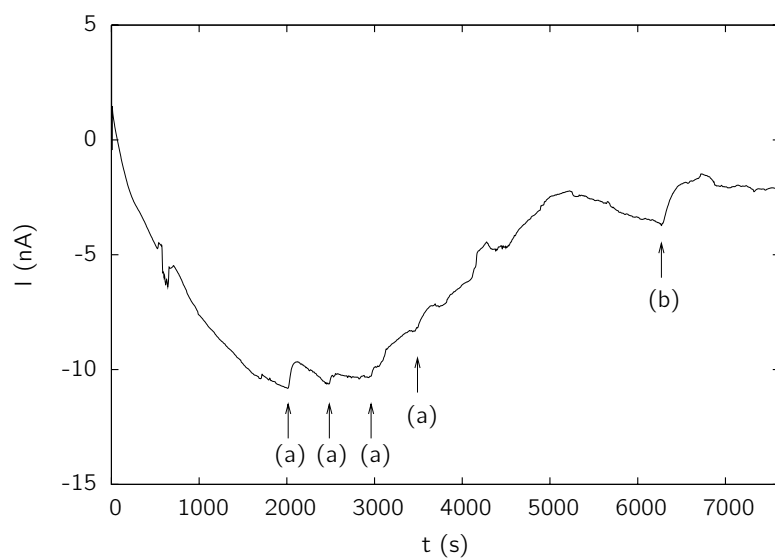


Abbildung 3.64: CME nach Nagy, Messung bei -0,1 V, Bedingungen ⑬, Potential -0,1 V. Zugaben von (a) 67 nmol Cyanid in 60 μL , (b) 135 nmol in 120 μL .

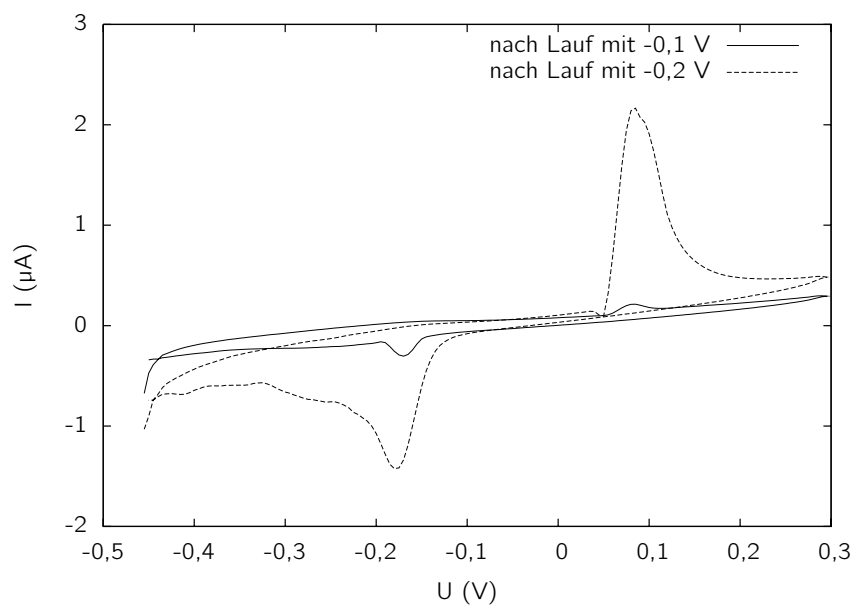


Abbildung 3.65: CV mit CME nach Messungen.

Da wie oben erwähnt ein Potential von $-0,2\text{ V}$ keine Sicherheitsspanne enthielt und die unbefriedigenden Ergebnisse dadurch begründet sein könnten, wurde eine weitere Messung bei einem Potential von $-0,1\text{ V}$ durchgeführt (Abbildung 3.64). Wie die Sensogramme zeigen, konnte dadurch keine Verbesserung der Situation erreicht werden. In cyclischen Voltammogrammen direkt nach Messungen (Abbildung 3.65) bei Potentialen von $-0,1$ und $-0,2\text{ V}$ wurden mit noch intaktem Messaufbau ein anodischer Peak bei ca. $0,08\text{ V}$ und ein kathodischer bei ca. $-0,17\text{ V}$ beobachtet. Als Erklärung wurden nicht näher spezifizierte Reaktionen vermutet, durch die im Laufe der Messung eine elektrochemisch aktive Spezies entstand, die erst ab einem Potential von ca. $0,08\text{ V}$ (anodischer Peak im CV) elektrochemisch oxidierbar war. Somit wäre diese Spezies bei den bisher angelegten Potentialen von $-0,2$ und $-0,1\text{ V}$ nicht erfasst worden. Die Beobachtung, dass Cyanidzugaben nach einer gewissen Zeit kein Signal mehr hervorriefen, könnte dadurch erklärt werden, dass die Elektronen von NADH auf diese Spezies statt auf MB übertragen wurden.

Um nun diese Spezies amperometrisch zu erfassen, wurden zwei Messungen bei einem Potential von $+0,2\text{ V}$ durchgeführt. Die Sensogramme (Abbildung 3.66) unterschieden sich deutlich von den vorigen Messungen bei negativen Potentialen, da zum einen eine bessere Stufenbildung zu erkennen war. Zum anderen erfolgte zumindest teilweise auch eine Reaktion auf mehrfache Zugaben. Cyclische Voltammogramme nach den Messungen enthielten keinen Peak bei $0,08\text{ V}$. Allerdings trat bei den Messungen erneut das Problem auf, dass die Stromerhöhung bei wiederholten Zugaben immer kleiner ausfiel. Somit schien auch eine Vermessung bei $+0,2\text{ V}$ mit dieser Vorbehandlungsmethode nicht zur Quantifizierung von Cyanid geeignet.

Trotz dieser Feststellung wurde noch untersucht, inwiefern der Einsatz des Rührpaddels Einfluss auf die Basislinie hatte. Zu diesem Zweck wurde eine weitere Messung bei $+0,2\text{ V}$, aber ohne Paddel vorgenommen (Abbildung 3.67). Auch hier war die Basislinie wesentlich unruhiger als z. B. bei der Messung in Abbildung 3.60 auf Seite 127, der keine elektrochemische Vorbehandlung vorangegangen war. Da zudem der Einsatz des Paddels außer einem etwas schnelleren Ansprechen des Sensors keine Vorteile erkennen ließ, wurden zukünftige Messungen ohne Paddel durchgeführt. Das Experiment an sich schlug fehl, Reaktionen auf Cyanidzugaben waren bis auf eine geringe Erhöhung der Steigung nach der ersten Zugabe nicht zu verzeichnen.

3.5.9 Benzochinonderivate als Mediator

Auf der Suche nach alternativen Mediatoren wurden Benzochinonderivate in Betracht gezogen. Diese sollten im Falle von o-Chinonen in den Positionen 3,4,5 und 6 und im Falle von p-Chinonen in den Positionen 2,3,5 und 6 substituiert sein, um einen nukleophilen Angriff von Cyanid zu erschweren. Es wurden vier kommerziell erhältliche Chinone gefunden, die die o. g. Bedingungen erfüllen: p-Chloranil, o-Chloranil, Tetrafluorop-benzochinon und Durochinon (Abbildung 3.68). Huck und Schmidt [HS81] berichteten über den erfolgreichen Einsatz von p-Chloranil als Mediator für NADH. Sie

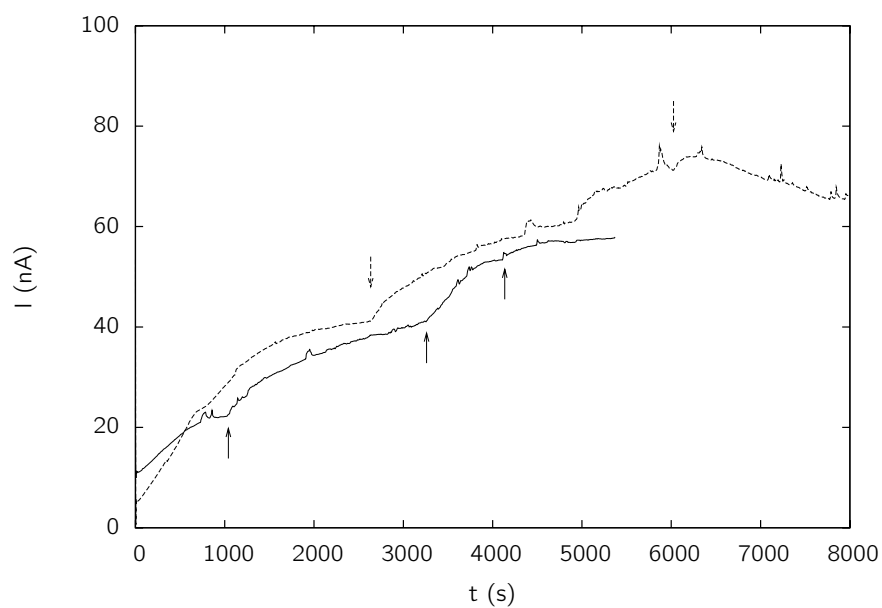


Abbildung 3.66: CME nach Nagy bei +0,2 V, Bedingungen ⑭, Potential 0,2 V. Pro Pfeil Zugabe von 67 nmol Cyanid.

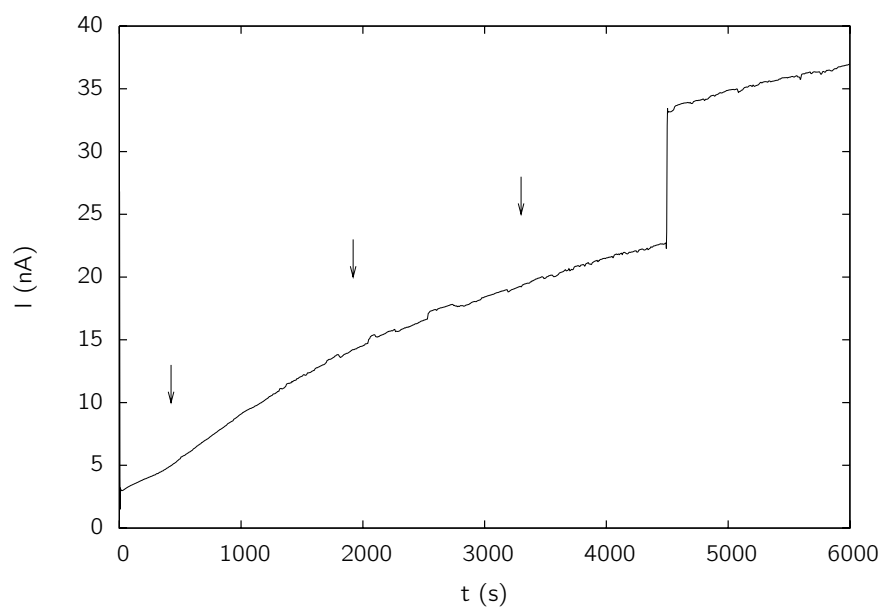


Abbildung 3.67: CME nach Nagy bei +0,2 V, ohne Rührpaddel, Bedingungen ⑮, Potential 0,2 V. Pro Pfeil Zugabe von 67 nmol Cyanid.

beschreiben dabei die Adsorption von p-Chloranil durch einfaches Auftropfen einer etherischen Lösung von p-Chloranil auf Graphitelektroden.

Um dies zu reproduzieren, wurden 10 μL einer p-Chloranillösung in TBME (41 μM) portionsweise auf die WE eines Chips vom Typ W5 getropft. Vor und nach Auftropfen wurde ein cyclisches Voltammogramm ($-0,3$ bis $0,7$ V, $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) in FPLC-Auftragepuffer pH 7,0 aufgenommen. Nach der Aufnahme dieses zweiten cyclischen Voltammogramms wurde der Elektrodenchip gründlich mit Wasser abgespült und erneut per CV überprüft. Wie die cyclischen Voltammogramme in Abbildung 3.69 zeigen, wäre p-Chloranil für eine Messung mit diesem Elektrodentyp geeignet, da ein guter anodischer Peak vorhanden ist. Allerdings wurde der Mediator durch Wasser wieder abgespült. Demnach war es nicht möglich, p-Chloranil fest an die Elektrode zu adsorbieren. Daraufhin wurde die Elektrode mit der in Kapitel 2.14.2 beschriebenen und bereits im vorigen Kapitel verwendeten Methode elektrochemisch vorbehandelt, wobei im Anschluss keine Adsorption von MB vorgenommen wurde, sondern erneut 10 μL der p-Chloranillösung aufgebracht wurden. Die Prozedur wurde nach jedem Schritt mittels CV überwacht (Abbildung 3.70). Die elektrochemische Vorbehandlung brachte, wie auch schon aus Kapitel 3.5.8 bekannt, eine Erhöhung des Grundstroms mit sich. Zudem zeigte sich eine wesentliche Verbesserung der elektrochemischen Eigenschaften der Elektrode bezüglich p-Chloranil. So sank das anodische Peakpotential von p-Chloranil gegenüber der nicht elektrochemisch vorbehandelten Elektrode von $0,257$ V auf $0,121$ V; zudem trat der kathodische Peak deutlicher hervor. Nach Abspülen des Chips war abermals kein Peak mehr zu sehen, woraus gefolgert werden kann, dass auch hier keine ausreichend feste Adsorption stattfand. o-Chloranil verhielt sich in der gleichen Weise, während im Falle von Tetrafluoro-p-benzochinon und Durochinon auch schon vor dem Spülschritt keine Peaks im cyclischen Voltammogramm zu erkennen waren.

Nachdem die letzteren beiden Substanzen sich allgemein als ungeeignet herausgestellt hatten und die Adsorption der beiden anderen Benzochinone nicht gelungen war, blieb als Möglichkeit noch die Zugabe von o- und p-Chloranil in die Mischung. Da die Substanzen aber in Wasser praktisch unlöslich sind, wurde keine Stammlösung der

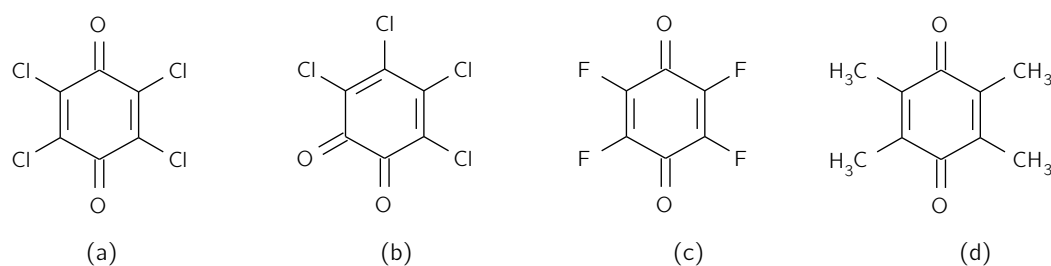


Abbildung 3.68: Benzochinonderivate. (a) p-Chloranil, (b) o-Chloranil, (c) Tetrafluoro-p-benzochinon, (d) Durochinon.

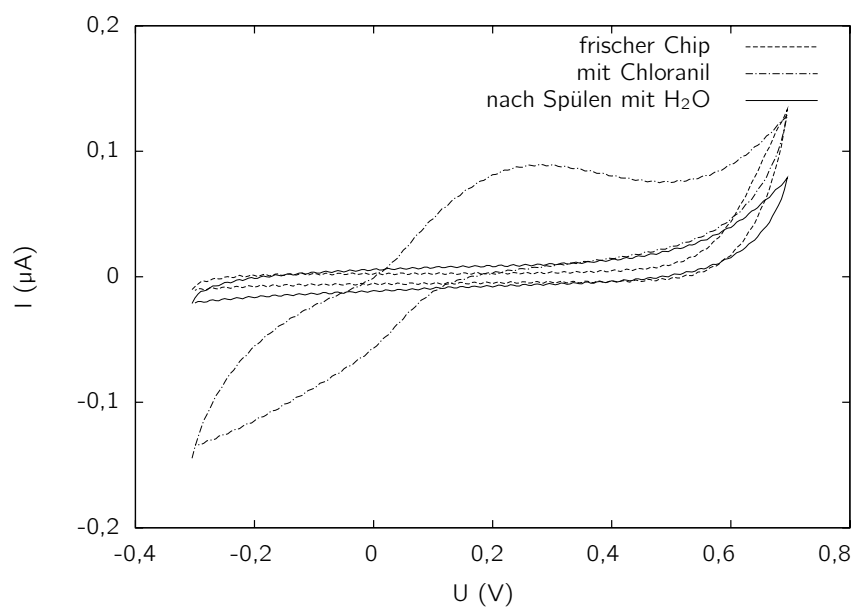


Abbildung 3.69: CV einer mit Chloranil behandelten Elektrode, Typ W5 (nicht elektrochemisch vorbehandelt).

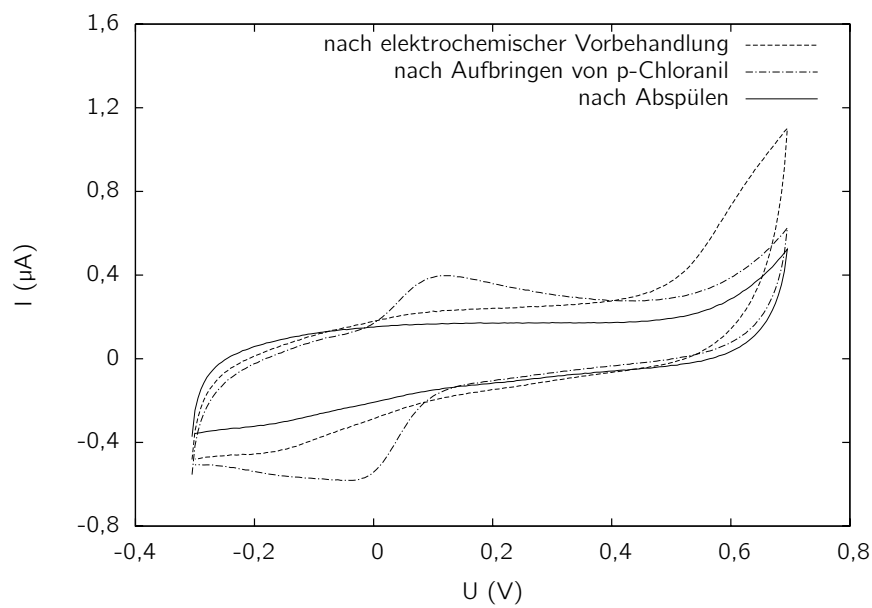


Abbildung 3.70: CV einer mit Chloranil behandelten Elektrode, Typ W5 (elektrochemisch vorbehandelt).

Substanzen zur Mischung hinzugegeben, sondern versucht, eine Mischung von Glycerol, Cyanidase, FDH und NAD^+ mit o-Chloranil in fester Form zu versetzen, um die Mischung mit Chloranil zu sättigen. Dabei fiel in großem Maße Protein aus. Zudem trat in einem cyclischen Voltammogramm, das nach Aufbringen dieser Mischung auf einen Chip vom Typ W5 durchgeführt wurde, kein Peak auf, der die Eignung der Mischung zur amperometrischen Vermessung anzeigte. Nach diesen Ergebnissen wurden keine weiteren Versuche mit Benzochinonderivaten durchgeführt.

3.5.10 Signal bei Wasserzugaben

An dieser Stelle werden Ergebnisse einer anderen Versuchsreihe dargestellt, da sie einen großen Einfluss auf die Fortführung der Experimente im Gasraum hatten. Die Arbeiten am Durchflusssensor sowie am Gassensor wurden parallel durchgeführt, deshalb wurden mit den aus Kapitel 3.3.1 bekannten, mit PB und PPY modifizierten Pt-WE auch Versuche im Gasraum unternommen. Bereits bei der Beschreibung der Ergebnisse dieser Elektroden im Durchflusssystem war festgestellt worden, dass Pt-WE von Cyanid angegriffen werden und deshalb ungeeignet sind. Jedoch wurden bei Messungen mit Pt-WE im Gasraum Beobachtungen gemacht, die auch für die Messungen mit Graphit-WE von Bedeutung sind.

Ein mit der in Kapitel 2.14.1 beschriebenen Methode mit PB und PPY modifizierter Pt-Elektrodenchip (Typ W2, Modifikationen siehe Abbildung 3.71) wurde in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 getaucht. Zunächst wurde für ca. 6 min ein Potential von 0,4 V, danach ein Potential von 0,3 V bis zum Erreichen einer Basislinie angelegt. Die Höhe des angelegten Potentials von 0,3 V wurde analog zu den Versuchen im Durchfluss (Kapitel 3.3.1) gewählt. Im Anschluss wurde der Chip bei anliegendem Potential von 0,3 V und Messung der Stromstärke (Abbildung 3.72) aus dem Biosensor-Fließmittel pH 7,0 entnommen und vorsichtig durch Abtupfen von Biosensor-Fließmittel pH 7,0 befreit. Hierbei wurden die Elektroden ausgespart, so dass diese weiterhin komplett von Biosensor-Fließmittel pH 7,0 bedeckt waren. In diesem Zustand wurde der Chip wenige Minuten in Raumluft belassen, bis er in einen Kolben (500 mL), der je 0,5 mL Phosphorsäure und KCl-Lösung (jeweils 1 M) enthielt, eingebracht wurde. Nach Einbringen wurde ein starker Anstieg der Stromstärke beobachtet. Daraufhin wurde der Chip wieder aus dem Kolben entnommen, worauf

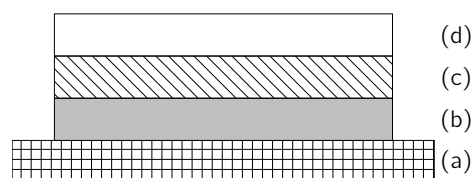


Abbildung 3.71: Pt-Elektrode (W2), chemisch modifiziert mit PB und PPY. (a) Inertes Chipmaterial, (b) Elektrodenmaterial (Pt), (c) PB, (d) PPY.

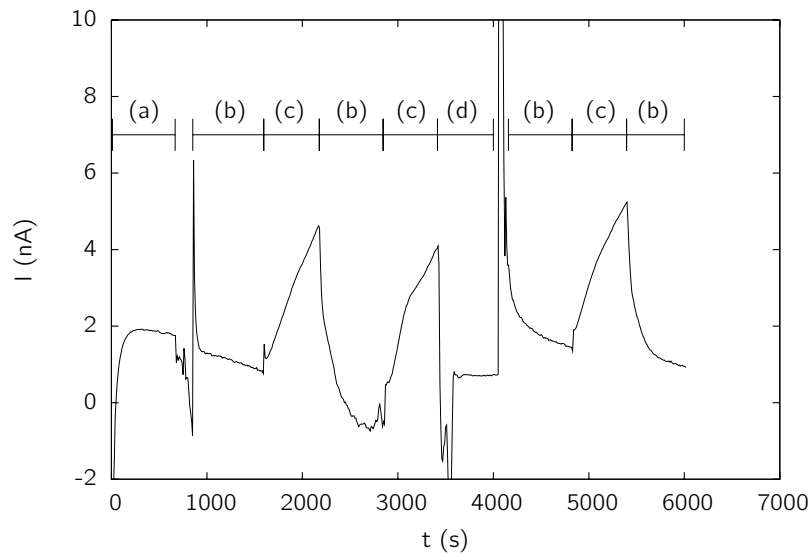


Abbildung 3.72: Puffer auf PB-PPY-Elektrode (W2), 1 mL Phosphorsäure/KCl (je 0,5 M) in Kolben mit 500 mL Gasraum, Bedingungen ⑩, Potential 0,3 V. (a) Einlaufen in Puffer, (b) in Raumluft, (c) in Kolben, (d) in Raumluft eingetrocknet, danach wieder befeuchtet.

die Stromstärke wieder abfiel. Dieser Wechsel von Einbringen und Herausnehmen wurde zweimal wiederholt, wobei das Phänomen reproduziert werden konnte. Da zwischenzeitlich der Puffer auf dem Chip eingetrocknet war, wurde frisches Biosensor-Fließmittel pH 7,0 auf die Elektroden pipettiert.

Da vermutet wurde, dass dieses Verhalten durch unterschiedliche Luftfeuchtigkeiten im Kolben und in der Raumluft begründet war, wurden weitere Versuche unter Abänderung der Säurekomponente im Kolben sowie der Flüssigkeit auf den Elektroden durchgeführt. Zum einen wurde die Säurekomponente durch 1 mL H_2O ersetzt. Die Elektroden waren bei diesem Experiment wie zuvor mit Biosensor-Fließmittel pH 7,0 bedeckt. Zum anderen wurde 1 mL einer Mischung aus Phosphorsäure (1 M) und Glycerol (1 + 3) als Säurekomponente und 4 μ L einer Mischung aus Biosensor-Fließmittel pH 7,0 und Glycerol (1 + 1) zur Befeuchtung der Elektroden eingesetzt. Beide Messungen finden sich in Abbildung 3.73. Mit reinem Wasser im Kolben zeigte sich das Phänomen stärker als bei Anwesenheit von Glycerol in der Säurekomponente und der Mischung auf dem Chip.

Bei einem den Messungen in den vorigen Kapiteln ähnlichen Experiment wurde eine weitere Beobachtung gemacht, die möglicherweise mit dem zuvor beschriebenen Phänomen in Zusammenhang steht. Ein mit PB und PPY modifizierter Elektrodenchip (W2) wurde in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 zunächst wenige Minuten bei 0,4 und anschließend bis zum Erreichen einer Basislinie bei 0,3 V gehalten. Nach vorsichtigem

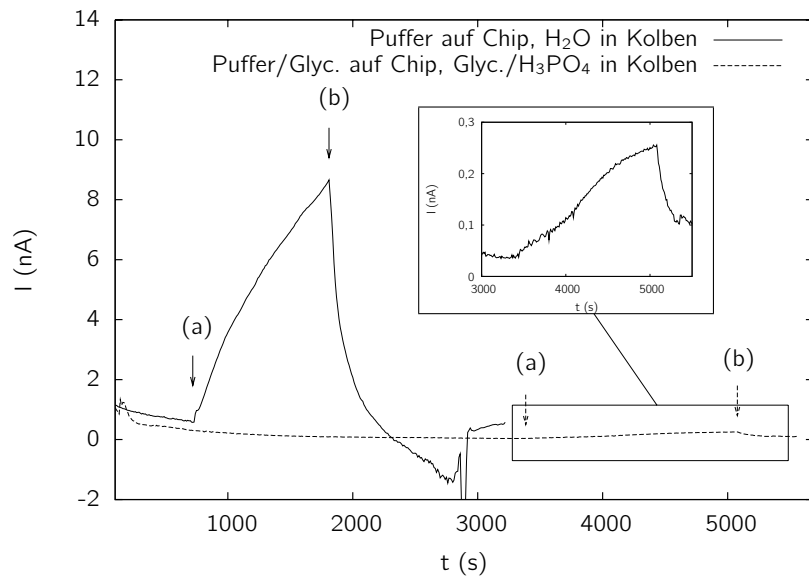


Abbildung 3.73: PB-PPY-Elektrode (W2), Bedingungen ⑩, Potential 0,3 V. (a) aus Raumluft in Kolben, (b) aus Kolben in Raumluft.

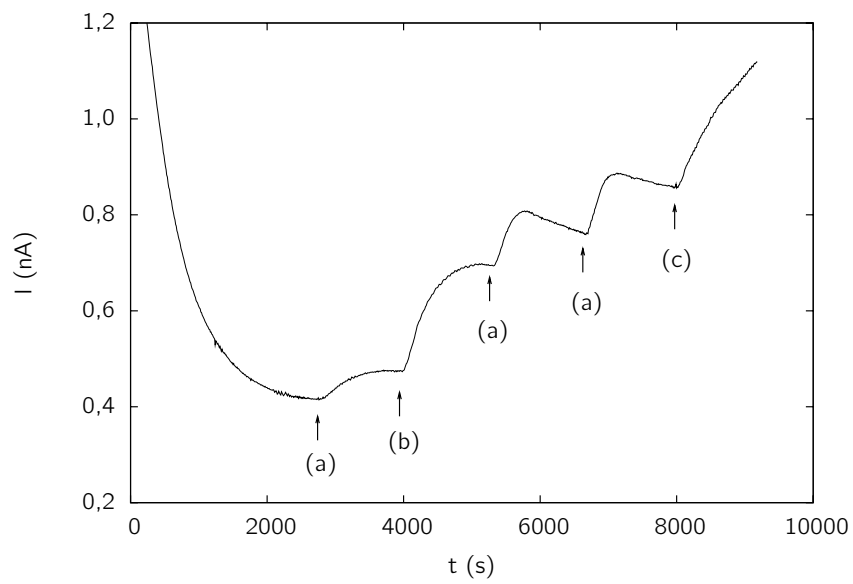


Abbildung 3.74: PB-PPY-Elektrode (W2), Bedingungen ⑪, Potential 0,3 V. Zugabe von (a) 30 nmol CN^- in 30 μL , (b) 30 nmol CN^- in 60 μL , (c) 30 μL NaOH 30 mM.

Entfernen des Puffers wurden die Elektroden mit 4 μL einer Mischung aus Cyanidase-Lösung und Glycerol (1 + 1) versetzt und der Chip in einen Kolben (500 mL Gasraum) eingebracht. Der Kolben enthielt 0,25 mL Phosphorsäure (1 M) und 0,75 mL Glycerol. Wie bereits erwähnt, erscheint eine Bestimmung von Cyanid mittels Detektion von Formiat an Pt-WE nach den Versuchen in Kapitel 3.3.1 nicht sinnvoll. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Messung aufgrund der Überlegung durchgeführt, dass Cyanidase-Lösung, welche die Elektroden bedeckt, die Pt-Elektrode möglicherweise vor Cyanid schützen kann. Zunächst zeigte sich auf Zugabe von Cyanid eine Stufe, wie im Sensogramm in Abbildung 3.74 zu sehen ist. Bei der zweiten Zugabe traf die Cyanidzugabe von 30 nmol in 30 μL NaOH 30 mM die Säurekomponente am Boden des Kolbens nicht exakt und es verblieb etwas Cyanid-Lösung außerhalb der Säure. Deshalb wurden nochmals 30 μL NaOH 30 mM in den Kolben auf den Tropfen mit Cyanid-Lösung pipettiert, um ihn in die Säure zu spülen. Der Sensor reagierte mit einer Stufe, die im Vergleich zur ersten Stufe doppelt so hoch war. Nun war aber nicht die Stoffmenge von Cyanid, sondern nur das zugegebene Volumen verdoppelt worden. Nach weiteren Cyanidzugaben wurde deshalb cyanidfreie NaOH (30 mM) zugegeben, woraufhin ebenfalls eine Sensorantwort erfolgte.

Auf der Suche nach dem Grund für diese Sensorantwort wurde die Messung mit einer unmodifizierten Pt-WE (W2) wiederholt, um zu überprüfen, ob dieses Phänomen durch die PB / PPY-Modifikationen zustande kam. Als Säurekomponente diente wiederum eine Mischung aus 0,25 mL Phosphorsäure (1 M) und 0,75 mL Glycerol. Auf dem Chip befanden sich 4 μL einer Mischung gleicher Teile Biosensor-Fließmittel pH 7,0 und Glycerol. Das Sensogramm der amperometrischen Messung bei einem Potential von 0,3 V ist in Abbildung 3.75 wiedergegeben. Die erste Zugabe, Phosphorsäure und Glycerol im gleichen Verhältnis wie in der Säuremischung im Kolben, bewirkte keine Änderung der Stromstärke. Dagegen sprach der Sensor auf Zugaben von NaOH (30 mM) an, wobei es keine Rolle spielte, ob die Natronlauge mit herkömmlichen Reagenzien oder mit hochreiner NaOH (Suprapur), gelöst in H_2O p. a., hergestellt worden war. Auf reines H_2O p. a. erfolgte ebenfalls eine Reaktion, die deutlich stärker war als auf Natronlauge.

Abbildung 3.76 belegt, dass dies kein für den Typ W2 spezifisches Verhalten ist. Auch Typ W5 reagiert bei einem Potential von 0,3 V auf Zugaben von Natronlauge und Wasser. Obwohl für diese Messung die Reihenfolge der Zugaben verändert wurde, indem als dritte Zugabe nicht hochreine Natronlauge, sondern H_2O p. a. und als vierte eine Cyanid-Lösung gewählt wurde, besteht eine Ähnlichkeit mit dem Sensogramm aus Abbildung 3.75. Bei beiden ist die zweite Stufe etwas höher als die erste. Die dritte Stufe ist nochmals deutlich höher als die ersten beiden, fällt aber nach Erreichen eines Peaks auf ein Niveau knapp unter dem Peak.

Durch die Sensitivität der Elektroden bezüglich Wasserzugaben besteht die Möglichkeit, dass Signale, die in den vorherigen Kapiteln scheinbar auf Cyanidzugaben erhalten wurden, in Wirklichkeit durch die Flüssigkeitszugaben zustande kamen. Allerdings waren die Experimente dieses Kapitels bei einem Potential von 0,3 V durchge-

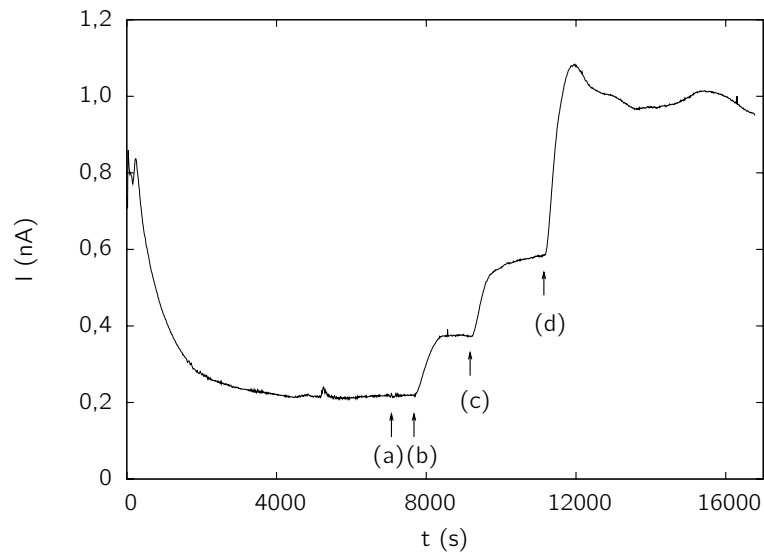


Abbildung 3.75: Unmodifizierte Pt-WE (W2), Bedingungen ⑱, Potential 0,3 V. Zugabe von je 30 μL (a) Glycerol/ H_3PO_4 (wie unten im Kolben), (b) verdünnte NaOH (p. a.) in H_2O , (c) verdünnte NaOH (Suprapur) in H_2O p. a., (d) H_2O p. a.

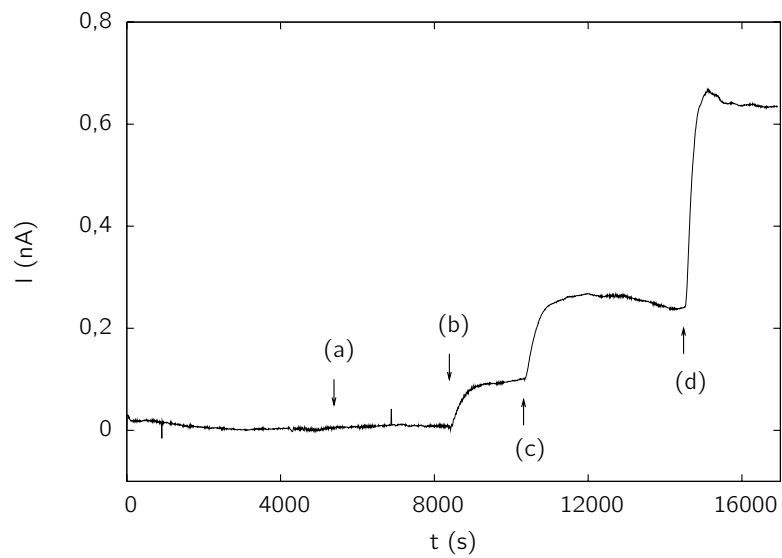


Abbildung 3.76: Elektrodentyp W5, Bedingungen ⑲, Potential 0,3 V. Zugabe von je 30 μL (a) Glycerol/Phosphorsäure (wie Säurekomponente im Kolben), (b) verdünnter NaOH (p. a.) in H_2O , (c) H_2O p. a., (d) 300 nmol CN^- .

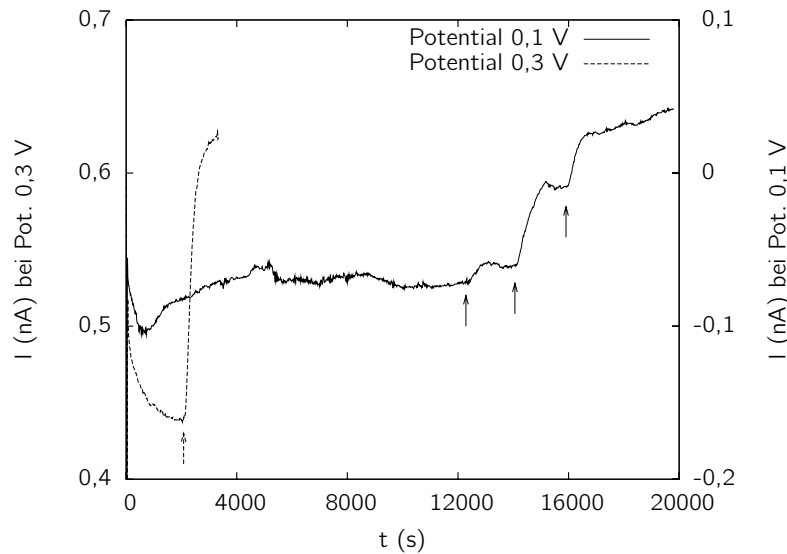


Abbildung 3.77: Elektrodentyp W5, Reaktion auf Wasserzugabe bei verschiedenen Potentialen, Bedingungen ②. Pro Pfeil Zugabe von 30 µL H₂O.

führt worden, während bei vorherigen Messungen ein Potential von 0,1 V eingestellt war. In Abbildung 3.77 sind Sensogramme, die bei Messungen mit Potentialen von 0,1 und 0,3 V erhalten wurden, gegenübergestellt. Zu beachten ist dabei, dass die Werte zwar verschiedene absolute Stromstärken haben, aber jeweils ein Bereich von 0,3 nA aufgetragen ist. Die Höhen sind demnach direkt vergleichbar. Säurekomponente, Volumen des Gasraums und Mischung auf der Elektrode (Typ W5) entsprachen dem zuvor beschriebenen Versuch (Reaktion eines Elektrodenchips vom Typ W5 auf Wasserzugaben). Bei einem Potential von 0,1 V zeigte sich eine niedrigere Sensorantwort auf Wasserzugaben als bei 0,3 V, ein Signal ist aber dennoch vorhanden.

3.5.11 Feste Säure

Die Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels könnten aufgrund der Änderung des Wasserdampfdrucks in der Gasphase zustande gekommen sein. Als Möglichkeit, die Änderung des Wasserdampfdrucks im Gasraum unter Beibehaltung der Freisetzung von Cyanid in die Gasphase zu verkleinern, wurde der Einsatz einer festen Säure, die Wasser zu binden vermag, in Betracht gezogen. Ein erster Versuch wurde mit wasserfreier Citronensäure unternommen. Hierfür wurden 3 g wasserfreie Citronensäure fein verrieben und zusammen mit einem Rührfisch in einen Kolben (500 mL) gegeben. Wie im vorigen Kapitel gezeigt, schien ein Potential von 0,1 V bezüglich Wassersignalen Vorteile zu besitzen. Dennoch wurden die folgenden Versuche aus den nachfolgend dargelegten Gründen bei einem Potential von 0,3 V durchgeführt. Zum einen sollte

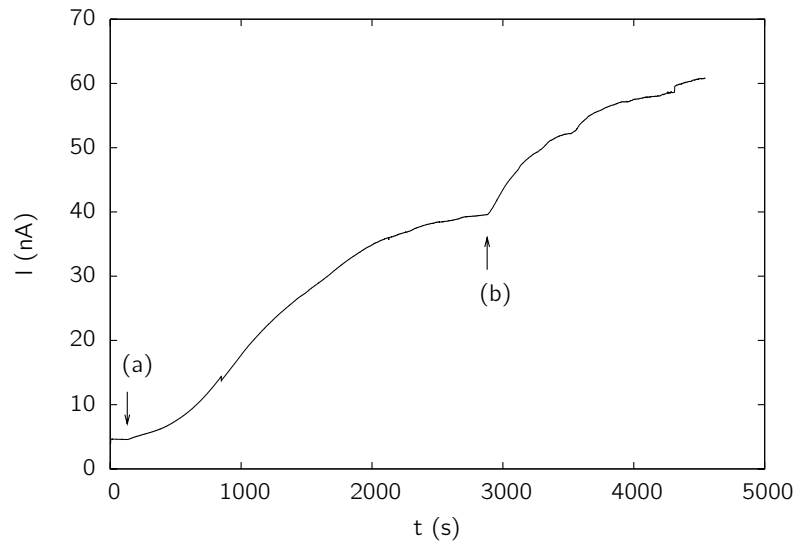


Abbildung 3.78: Elektrodentyp W2, bedeckt mit Cyanidase/Glycerol, 3 g wasserfreie Citronensäure im Kolben, Bedingungen ②1, Potential 0,3 V. Zugaben (je 10 μL): (a) 10 nmol CN^- , (b) NaOH 30 mM.

das Wassersignal bei Experimenten zur Unterdrückung desselben nicht bereits durch das gewählte Potential weitgehend beseitigt werden, um die Wirksamkeit der zu untersuchenden Säurekomponente besser beurteilen zu können. Zum anderen wurde mit einem Elektrodenchip vom Typ W2 gemessen, der mit 2 μL einer Mischung aus gleichen Teilen Cyanidase-Lösung und Glycerol bedeckt war. Mit diesem Elektrodentyp wurde analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.1 bei einem Potential von 0,3 V ein sicheres Signal auf Cyanid erwartet, hervorgerufen entweder durch Formiat oder durch den direkten Einfluss von Cyanid auf die Pt-WE.

Wie das Sensogramm in Abbildung 3.78 zeigt, konnte der Einsatz von wasserfreier Citronensäure das Signal auf eine Zugabe von cyanidfreier Natronlauge nicht verhindern. Vielmehr waren Cyanid- und Natronlaugensignal praktisch gleich stark ausgeprägt.

Um das zugegebene Wasser stärker zu binden, wurde der Citronensäure ein Trocknungsmittel zugegeben. Eingesetzt wurde eine fein verriebene Mischung aus 3 g wasserfreier Citronensäure und 3 g getrocknetem CaCl_2 . Bei den hiermit unternommenen Messungen (Abbildungen 3.79 und 3.80) trat nun keine dauerhafte Erhöhung der Stromstärke bei Zugaben von Wasser mehr auf. Allerdings zeigte auch die Zugabe einer relativ hohen Stoffmenge Cyanid (300 nmol) keine Auswirkung. Von Pt-WE, die mit einer Mischung aus Cyanidase-Lösung und Glycerol bedeckt waren, wurde aber bei Anwesenheit von Blausäure im Gasraum eine Reaktion erwartet. Wie bereits erwähnt, sollte diese Reaktion entweder durch das direkte Auftreffen von Cyanid auf die WE oder durch Formiat entstehen (vgl. hierzu Kapitel 3.3.1).

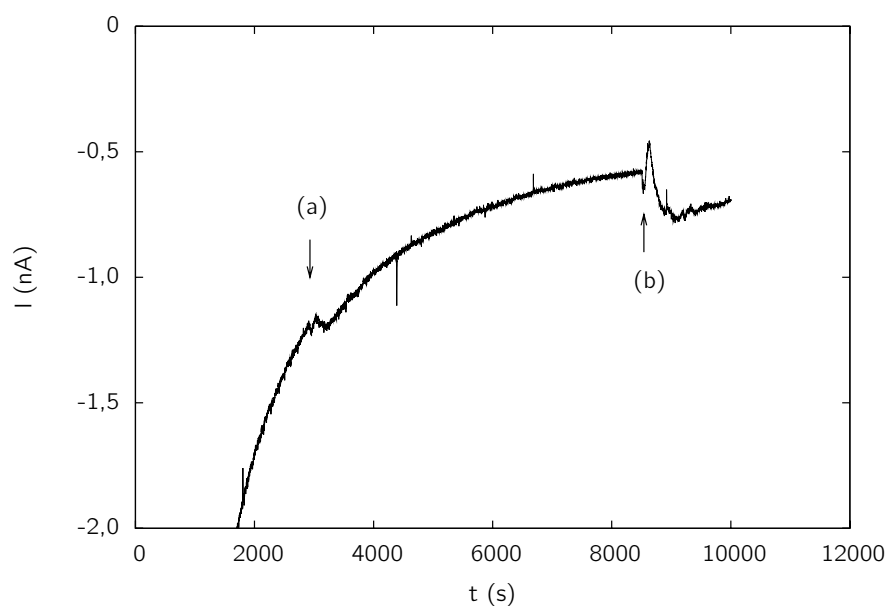


Abbildung 3.79: Elektrodentyp W2, bedeckt mit Cyanidase/Glycerol, 3 g wasserfreie Citronensäure + 3 g getrocknetes CaCl_2 im Kolben, Bedingungen ②②, Potential 0,3 V. Zugaben (je 30 μL): (a) 300 nmol CN^- , (b) H_2O p. a.

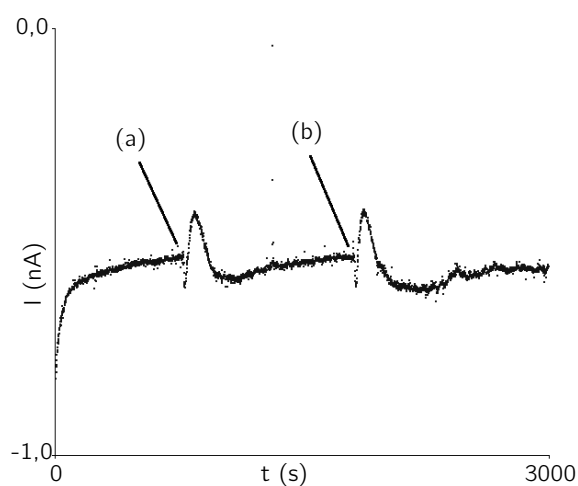


Abbildung 3.80: Elektrodentyp W2, bedeckt mit Cyanidase/Glycerol, 3 g wasserfreie Citronensäure + 3 g getrocknetes CaCl_2 im Kolben, Bedingungen ②②, Potential 0,3 V. Zugaben (je 30 μL): (a) H_2O p. a., (b) 300 nmol CN^- .

3.5.12 Großes Säurevolumen, Temperaturkorrelation

Um den Einfluss von Temperaturschwankungen auf das Sensorsystem zu untersuchen, wurde eine Messung durchgeführt, bei der ein Temperatursensor im Gasraum integriert war (Abbildung 3.81). Bei diesem Experiment wurde zudem untersucht, ob eine Erhöhung des Säurevolumens die rein durch Flüssigkeit verursachten Signale unterdrücken kann. Bei Zugaben gleicher Volumina Wasser in verschiedene Volumina Säure ergeben sich unterschiedliche Änderungen der Osmolarität der Säure. Diese sind umso niedriger, je höher das Säurevolumen ist. Unter der Annahme, dass das Signal von einer Änderung des Wasserdampfdrucks im Gasraum hervorgerufen wird, sollte eine geringere Änderung der Osmolarität der Säurekomponente eine geringere Änderung des Wasserdampfdrucks und somit ein kleineres Signal durch Flüssigkeit bewirken. Allerdings geht nach dem Gesetz von Henry (Kapitel 3.5.2) bei einem höheren Säurevolumen auch ein geringerer Anteil der Blausäure in die Gasphase über.

Für die Messung wurden 30 mL verdünnte Schwefelsäure gemischt mit 30 mL Glycerol als Säurekomponente eingesetzt. Auf dem Chip befanden sich 4 μL einer Mischung gleicher Teile FPLC-Lösepuffer pH 7,0 und Glycerol. Da ein 500 mL Dreihalskolben verwendet wurde, blieben noch ungefähr 440 mL Gasraum. Die Sensogramme lassen eine Korrelation der Stromstärke mit der Temperatur erkennen. Weiterhin änderte sich die Stromstärke bei Zugaben relativ zum Gesamtverlauf des Signals nur wenig.

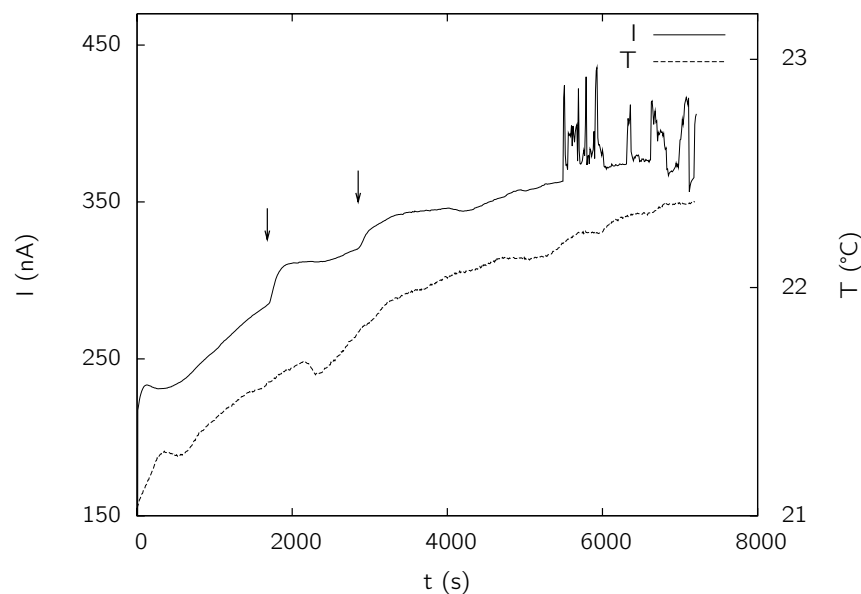


Abbildung 3.81: W2-Elektrode mit Puffer/Glycerol, 30 mL H_2SO_4 + 30 mL Glycerol im Kolben, Bedingungen ②③, Potential 0,3 V. Pro Pfeil Zugabe von 30 μL H_2O p. a.

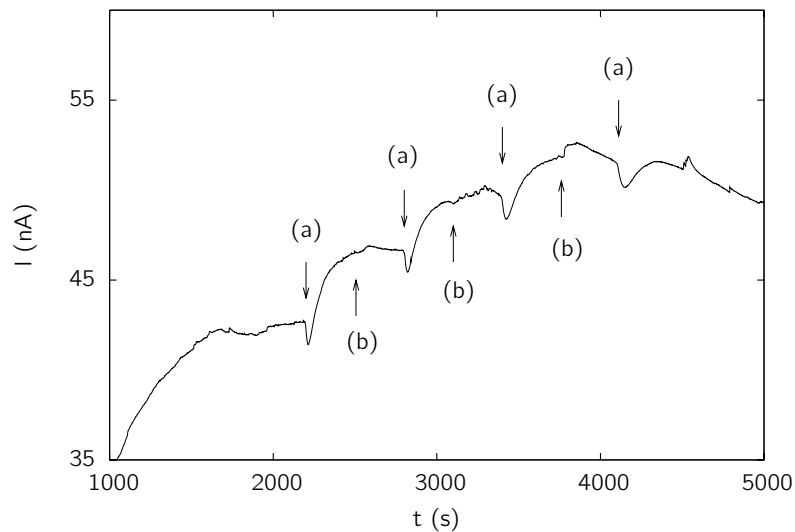


Abbildung 3.82: W2-Elektrode, bedeckt mit Cyanidase + Glycerol (1 + 1), Säurekomponente 30 mL H_2SO_4 + 30 mL Glycerol, Bedingungen ②③, Potential 0,3 V. Zugaben (je 30 μL): (a) 300 nmol CN^- , (b) H_2O p. a.

Absolut ergab sich aber z. B. nach der ersten Zugabe eine Erhöhung der Stromstärke um ca. 20 nA. Die Stärke des Hintergrundstroms war verglichen mit bisherigen Messungen sehr hoch.

In einer weiteren Messung (Abbildung 3.82), die ohne Temperatursensor, aber mit Cyanidase/Glycerol auf dem Elektrodenchip und wiederum einer Mischung von 30 mL verdünnter Schwefelsäure und 30 mL Glycerol im Kolben durchgeführt wurde, konnten nur sehr schwache Reaktionen auf Wasserzugaben erhalten werden. Cyanidzugaben von 300 nmol dagegen zeigten ein höheres Signal.

3.5.13 Gleichzeitige Blindmessung

Nachdem es zum einen mittels fester Säure nicht gelungen war, die Reaktion des Sensors auf Wasser zu unterdrücken und gleichzeitig ein Signal auf Cyanidzugaben zu erhalten, und zum anderen auch die Temperatur das System beeinflussen könnte, wurde der Aufbau erweitert. Nun wurden, wie in Abbildung 2.9B schematisch dargestellt, zwei Elektrodenchips zusammen mit zwei Potentiostaten vom Typ Palm-Sens eingesetzt. Jeweils einer der beiden Chips wurde mit einer Mischung bedeckt, die Cyanidase-Lösung enthielt. Bei der Mischung des anderen Chips wurde die Cyanidase-Lösung durch FPLC-Lösepuffer pH 7,0 ersetzt. Dadurch sollte es möglich sein, den Anteil der Reaktion des Sensors auf Änderungen des Wasserdampfdrucks und der Temperatur aus dem Gesamtsignal herauszurechnen. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht: Detektion von NADH bei 0,8 V sowie Einsatz von

MB als Mediator. Als Gasraum wurde bei allen Messungen ein Dreihalskolben mit einem Volumen von 1 L benutzt. Die zum Einsatz kommende Säurekomponente bestand aus 1 mL einer Mischung von 0,78 Teilen verdünnter Schwefelsäure und 1 Teil Glycerol. Da mit diesem Aufbau auch untersucht werden sollte, wie hoch der Cyanidanteil am Signal in Messungen der Kapitel 3.5.4 bis 3.5.8 war, wurde ein kleines statt wie im vorangegangenen Kapitel untersuchtes großes Säurevolumen verwendet.

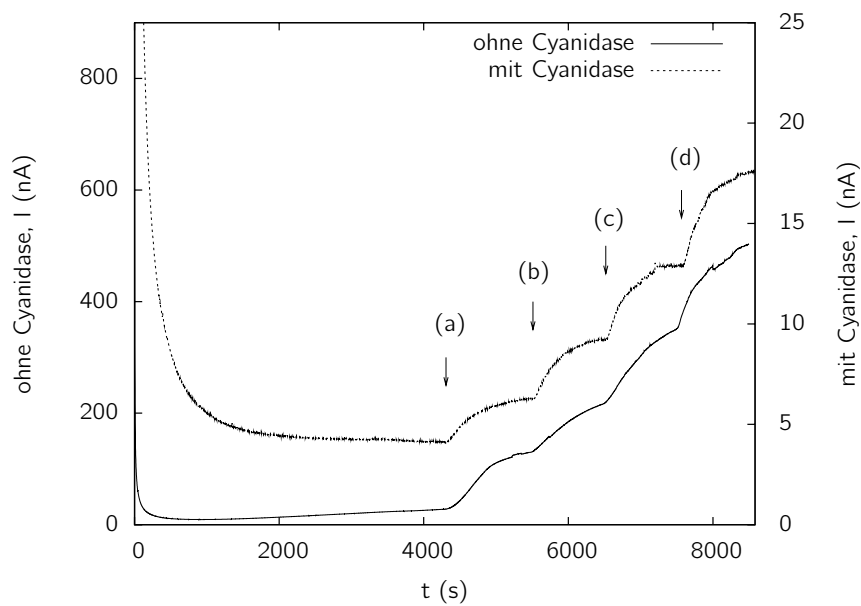
Die Bestimmung von NADH bei 0,8 V ist angelehnt an den in Kapitel 3.4 beschriebenen Durchflusssensor. Dementsprechend enthielt die Mischung auf den Elektroden Cyanidase, FDH und NAD^+ , aber keinen Mediator. Als Feuchthaltemittel und Viskositätserhöher wurde wie üblich Glycerol eingesetzt. Wie Abbildung 3.83 zeigt, bewegten sich die Messwerte der beiden Chips in sehr unterschiedlichen Größenordnungen. Das Signal des Chips mit Cyanidase durchschritt einen Bereich von ca. 12 nA, während das Signal des Chips ohne Cyanidase Stufen von insgesamt ca. 500 nA aufwies. In gleicher Skalierung aufgetragen, ist das Signal des Chips mit Cyanidase fast nur als Basislinie sichtbar (Abbildung 3.83B). Die geplante Differenzbildung beider Messungen, um das von Cyanid verursachte Signal herauszufiltern, war folglich nicht möglich. Bei einer Auftragung gegen unterschiedliche Skalierung ist dagegen ein qualitativ gleicher Verlauf zu erkennen (Abbildung 3.83A). Selbst eine Stoffmenge von 500 nmol Cyanid rief bei beiden Chips keine höhere Reaktion als Natronlauge hervor.

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Anteil Wasser am Gesamtsignal bei Messungen mit MB als Mediator (Kapitel 3.5.4 bis 3.5.8) hat. Zu diesem Zweck wurden drei Messungen durchgeführt, wobei die Mischungen auf den Chips neben Glycerol auch FDH, NAD^+ und MB enthielten. Wie zuvor enthielt nur die Mischung eines Chips Cyanidase. Die Sensogramme sind in den Abbildungen 3.84, 3.85 und 3.86 wiedergegeben. Bis auf leichte, für diese Untersuchungen vernachlässigbare Unterschiede in der Aktivität der Cyanidase-Lösung, was sich in unterschiedlichen absoluten Enzymaktivitäten in der Mischung von 61 bis 75 nkat·mL⁻¹ niederschlug, waren die Bedingungen der drei Messungen gleich. Dennoch wurden sehr verschiedene Sensogramme erhalten.

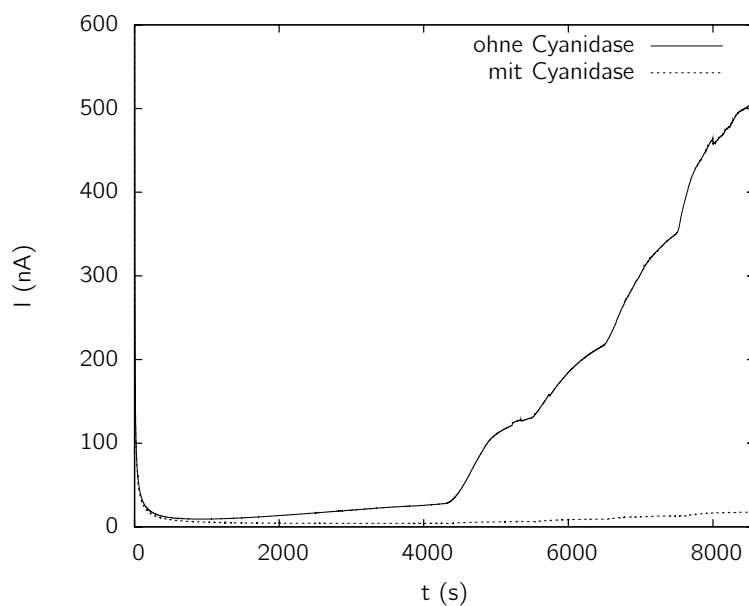
Bei einer Messung (Abbildung 3.85) reagierte der Chip mit Cyanidase auf Natronlauge und Cyanid nahezu gleich. Die Blindmessung, die sich in einem wesentlich geringeren Strombereich abspielte, war geprägt von Rauschen und Stromanstiegen.

Zwei Messungen zeigten dagegen bei dem Chip mit Cyanidase einen deutlichen Unterschied in der Sensorantwort bezüglich Cyanid und Wasser. Auf Zugaben von Natronlauge erfolgte hier fast keine Reaktion, während besonders bei der in Abbildung 3.84 dargestellten Messung Cyanidzugaben einen starken Anstieg der Stromstärke verursachten. Allerdings fiel bei Zugaben von Cyanidstoffmengen von 0,9 und 9 µmol die Stromstärke nach Erreichen eines Peaks wieder ab.

Bei der in Abbildung 3.86 wiedergegebenen Messung konnte zwar auch ein höheres Signal bei Cyanidzugaben im Vergleich zu Wasserzugaben beobachtet werden, jedoch wies das Signal des Chips mit cyanidasehaltiger Mischung ein hohes Rauschen sowie Artefakte auf.

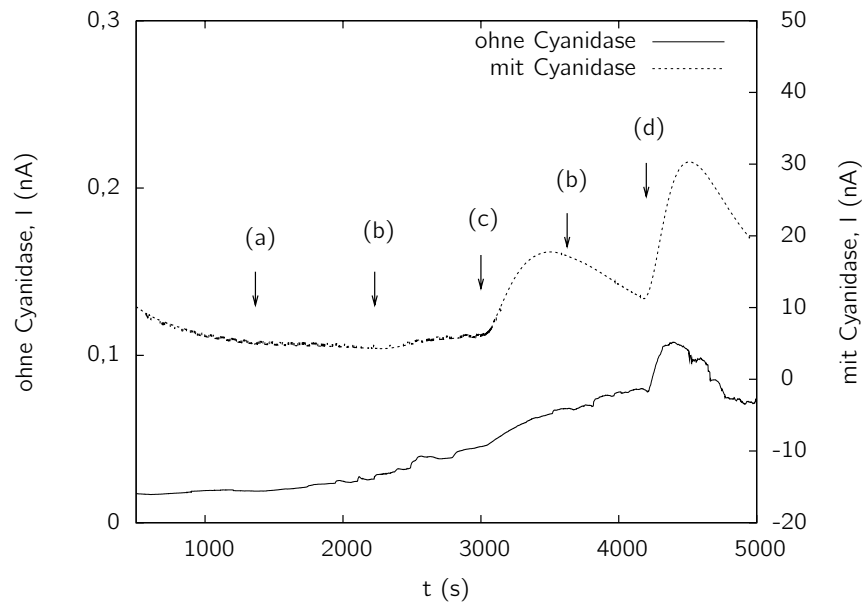


A Verschiedene y-Skalierung

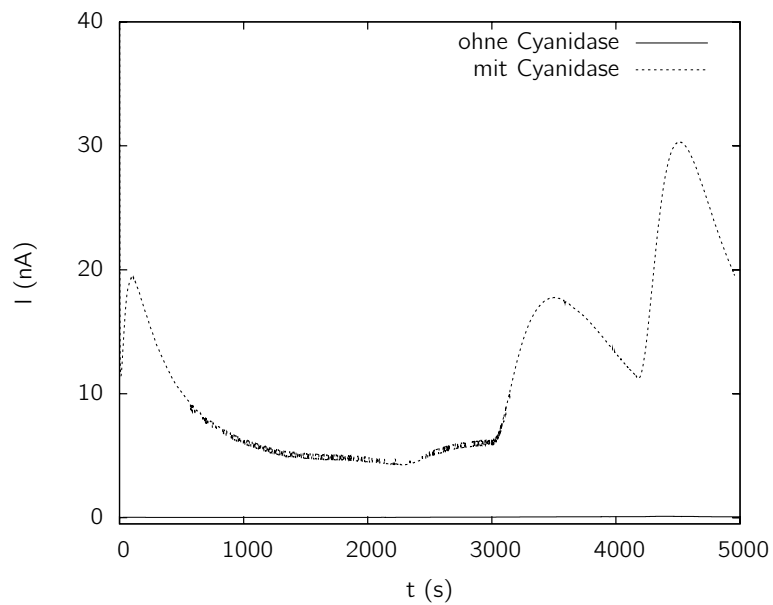


B Gleiche y-Skalierung

Abbildung 3.83: Messung mit zwei W4-Elektroden, davon eine ohne Cyanidase, Bestimmung von NADH bei 0,8 V, Bedingungen ②④, Potential 0,8 V. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN^- 90 nmol, (c) CN^- 0,9 μmol , (d) CN^- 9 μmol .



A Verschiedene y-Skalierung



B Gleiche y-Skalierung

Abbildung 3.84: Messung mit zwei W5-Elektroden, davon eine ohne Cyanidase. MB als Mediator, 0,1 V, Bedingungen ②⑤, Potential 0,1 V. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN^- 90 nmol, (c) CN^- 0,9 μmol , (d) CN^- 9 μmol .

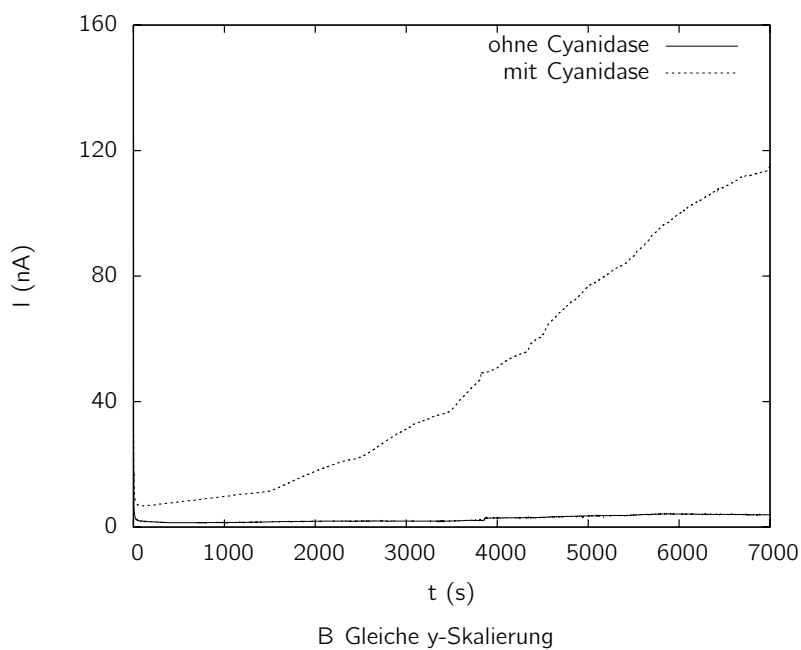
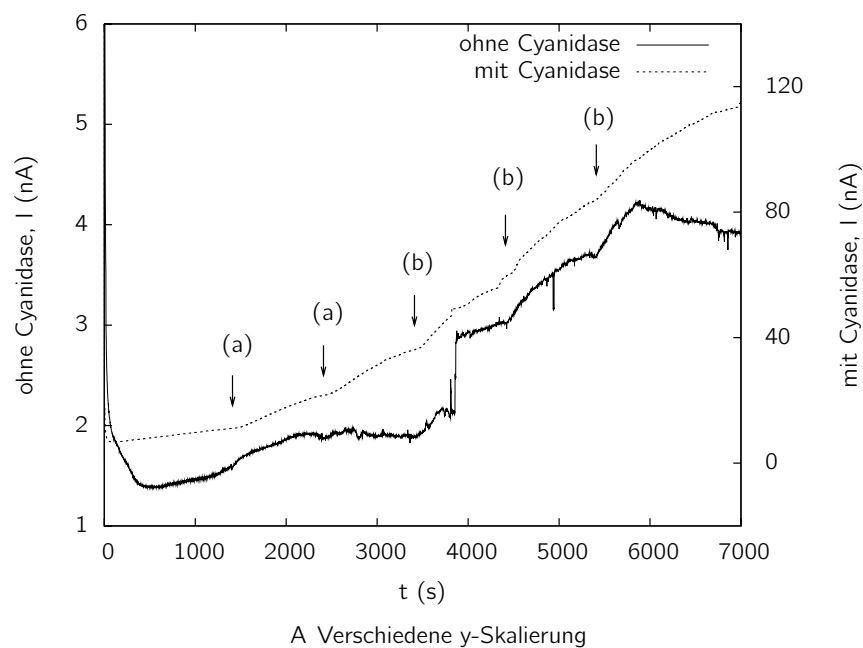
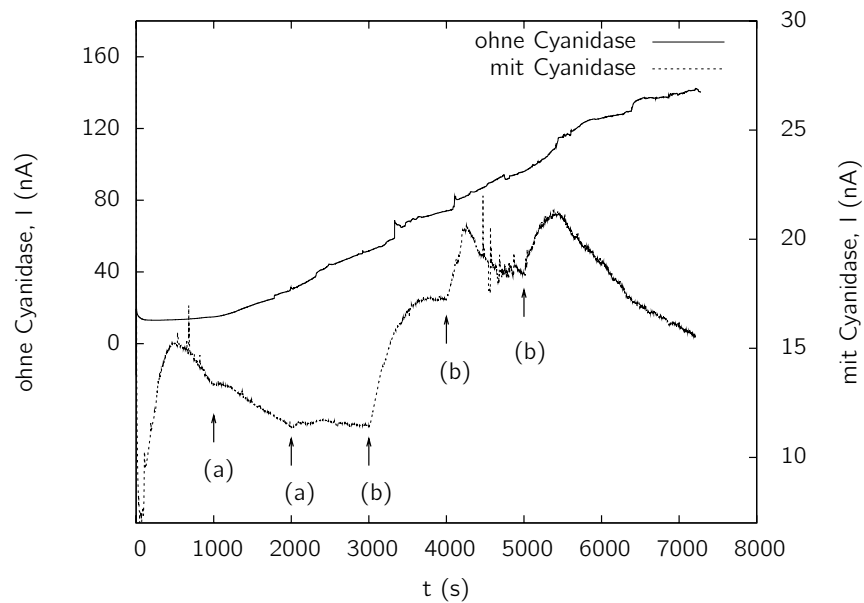
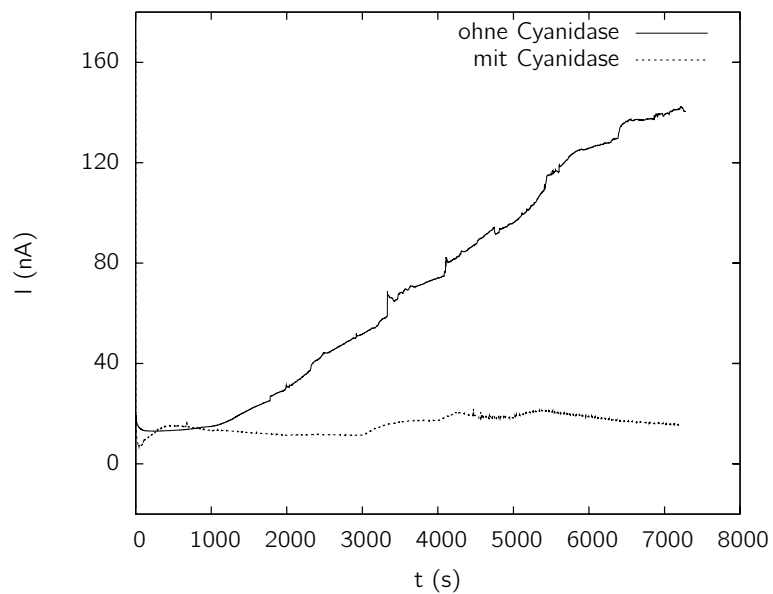


Abbildung 3.85: Messung mit zwei W5-Elektroden, davon eine ohne Cyanidase. MB als Mediator, 0,1 V, Bedingungen ②⑨, Potential 0,1 V. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN^- 126 nmol.



A Verschiedene y-Skalierung

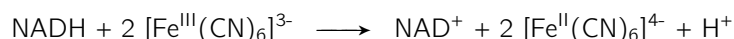


B Gleiche y-Skalierung

Abbildung 3.86: Messung mit zwei W5-Elektroden, davon eine ohne Cyanidase. MB als Mediator, 0,1 V, Bedingungen ②⑨, Potential 0,1 V. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN⁻ 126 nmol.

3.5.14 Kaliumhexacyanidoferrat als Mediator

Im letzten Versuch dieser Reihe wurde noch ein weiterer Mediator in Betracht gezogen. Kaliumhexacyanidoferrat ist inert gegenüber Cyanid, da das zentrale Fe-Ion des Komplexes bereits mit Cyanid abgesättigt ist. Die grundsätzliche Möglichkeit, Hexacyanidoferrat als Mediator für NADH zu verwenden, ist hinreichend belegt, beispielsweise von Yon Hin und Lowe [YHL87]. Zwei Moleküle Hexacyanidoferrat-III nehmen dabei je ein Elektron von NADH auf:



Die Eignung der Elektrodentypen der Firma BVT für Messungen mit diesem Mediator wurde durch CV in einer Lösung von Kaliumhexacyanidoferrat-II (10 mM) in Biosensor-Fließmittel pH 7,0 untersucht. Die jeweils zweiten bei einer Scanrate von $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ aufgenommenen Durchläufe jedes Elektrodentyps (Abbildung 3.87) zeigten jedoch nur für den Elektrodentyp W2 ein reversibles Redoxverhalten. Typ W5 scheint nicht in der Lage zu sein, mit Hexacyanidoferrat Elektronen auszutauschen. Bei Typ W4 liegt zwar eine deutliche Hemmung der Elektronenübertragung vor, jedoch sollte mit der Wahl eines Potentials, das höher als das anodische Peakpotential von 0,45 V ist, eine Detektion möglich sein.

Da aus Messungen im Durchfluss bekannt war, dass eine Pt-WE für Messungen von Cyanid ungeeignet ist (Kapitel 3.3.1), wurden zwei Elektroden vom Typ W4 für eine Messung bei 0,55 V ausgewählt. Wiederum enthielt nur die Mischung auf einem Chip Cyanidase. Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen mit zwei gleichzeitig im Gasraum vorhandenen Elektrodenchips lagen die Signale von Blind- und Cyanidase-Chip erstmals innerhalb der gleichen Größenordnung. Wie in Abbildung 3.88 zu sehen ist, zeigten beide Sensogramme auch die gleichen Tendenz des Signals bei Zugaben. Ein durch Cyanidzugaben hervorgerufener Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr ähneln die Sensogramme denen aus Abbildung 3.54 auf Seite 122, wobei der Blindchip dieser Messung dem schrägen und der Chip mit Cyanidase dem fast waagrechten Chip aus Abbildung 3.54 entspricht. Die Reaktion auf zwei aufeinander folgende Zugaben von verdünnter Natronlauge fiel unterschiedlich aus. Während die erste Zugabe nur eine kleine, vorübergehende Erhöhung der Stromstärke bewirkte, wurde durch die zweite Zugabe des gleichen Volumens cyanidfreier Lösung eine wesentlich höhere, recht stabile Stufe hervorgerufen. Nachfolgende Cyanidzugaben konnten die Höhe dieser Stufe nicht übertreffen.

Die bereits zuvor in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Versuche ließen darauf schließen, dass ein Potential von 0,55 V für die Enzyme unschädlich ist. Um sicherzustellen, dass das fehlende Ansprechen auf Cyanid nicht durch ein zu hohes, für die Enzyme schädliches Potential bedingt war, wurde dennoch eine weitere Messung bei einem möglichst niedrigen Potential durchgeführt. Beim gewählten Potential von 0,3 V befindet sich die Stromstärke im CV mit Kaliumhexacyanidoferrat-II und dem Elektrodentyp W4 gerade im Anstieg, wodurch dies das niedrigst mögliche Potential für eine amperometrische Messung darstellt.

Das Experiment ist in Abbildung 3.89 wiedergegeben. Während der Stromfluss des Blindchips nach der ersten Zugabe von Natronlauge stark anstieg und auch auf weitere Zugaben reagierte, war bei dem Chip mit Cyanidase nur eine leichte Stromänderung zu sehen. Den größten Anteil an dieser Änderung besaß die Antwort auf die erste Zugabe (Natronlauge), der restliche Teil entfiel auf die zweite Zugabe mit 90 nmol Cyanid. Nachfolgende Zugaben von 0,9 und 9 μmol Cyanid bewirkten keine Reaktion mehr. Somit scheint Kaliumhexacyanidoferrat als Mediator in Kombination mit Elektrodenchips der Firma BVT nicht geeignet zu sein.

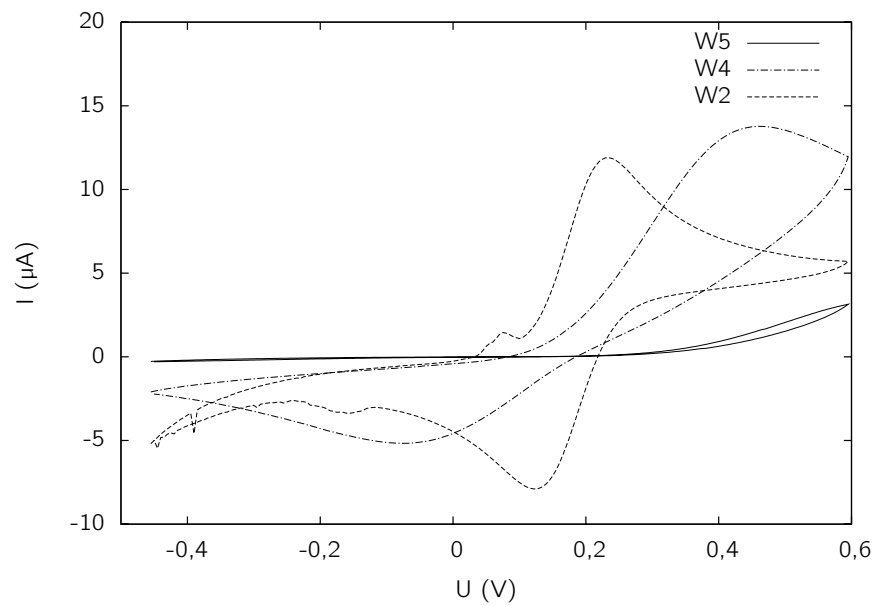


Abbildung 3.87: CV mit Hexacyanidoferrat-II 10 mM in Biosensor-Fließmittel pH 7,0, $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$.

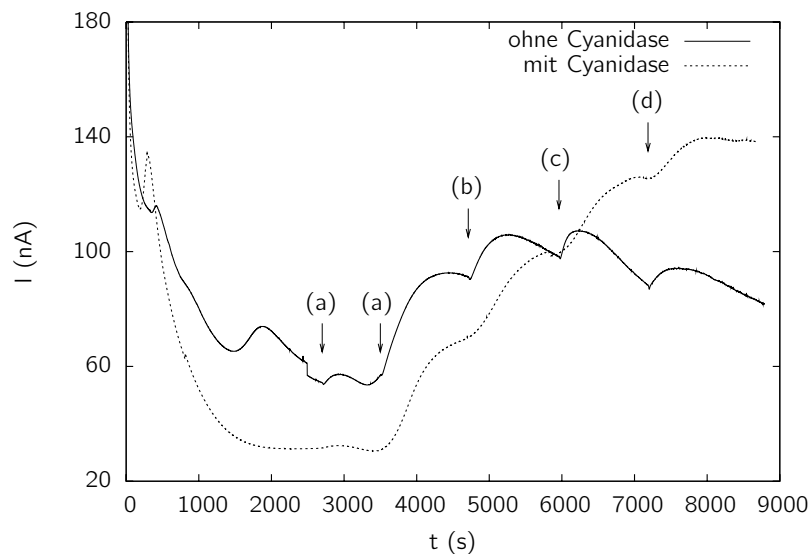


Abbildung 3.88: Typ W4, Mischung mit Hexacyanidoferrat-III, Potential 0,55 V, Bedingungen 27, Potential 0,55 V. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN^- 82 nmol, (c) CN^- 0,82 μmol , (d) CN^- 8,2 μmol .

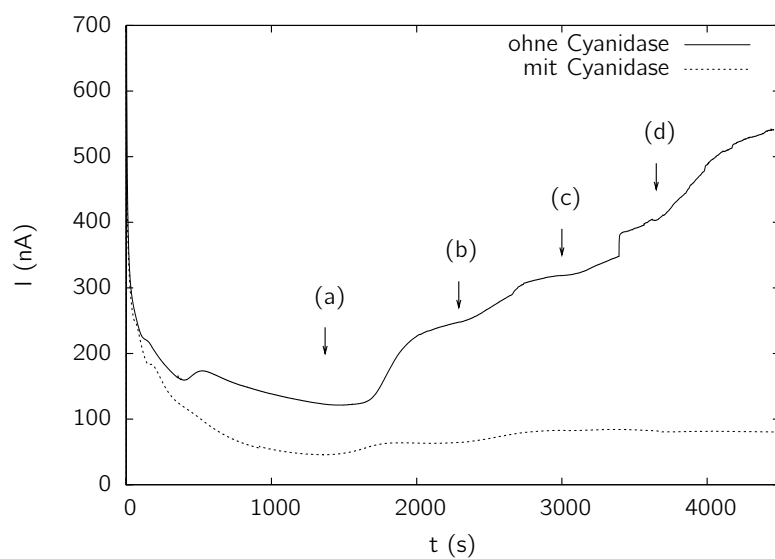


Abbildung 3.89: Typ W4, Mischung mit Hexacyanidoferrat-III, Potential 0,3 V, Bedingungen 28, Potential 0,3. Zugaben (immer 100 μL): (a) NaOH 30 mM, (b) CN^- 90 nmol, (c) CN^- 0,9 μmol , (d) CN^- 9 μmol .

Tabelle 3.14: Detaillierte Bedingungen bei Messungen im Gasraum. Nähere Erläuterungen siehe Kapitel 3.5.1 auf Seite 113.

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
Mischung										
% Glycerol (V/V)	53,3	53,3	53,3	53,3	50,8	50,8	50,8	50,8	53,3	53,3
β (MB) (mg mL ⁻¹)	0,67	0,67	0,67	0,67	0,95	0,95	0,95	0,95	1	1
β (NAD) (mg mL ⁻¹)	1,33	2,66	2,66	2,66	3,8	3,8	3,8	3,8	4	4
Cyanidase (nkat mL ⁻¹)	43	68,5	52	59	30–38	29	44	68	43	37
FDH (nkat mL ⁻¹)	249	249	249	249	237	237	237	237	249	249
zusätzliche Bestandteile?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elektrode										
Elektrodentyp	W5	W5	W5	W5	W5	W5	W5	W5	BST/C	BST/C
V(Mischung) auf Chip (μL)	10	10	2	10	2	2	2	2	≤ 2	≤ 4
Potential (V)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Gasraum										
Säure	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ / Glycerol (1/1,03)	H ₃ PO ₄ 1M/ Glycerol (1/1,03)	H ₃ PO ₄ 1M	-	-
V(Säure) (mL)	1,9	1,9	1,9	s. Diag.	1	1	1	1	-	-
V(Gasraum) (mL)	27	27	27	27	500	500	28	500	-	-
Sonstige Bedingungen										
Wasserbad (°C)	-	-	-	-	25	26,8	25	25	-	-
Luft gerührt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳
Mischung										
% Glycerol (V/V)	56,1	56,1	56,1	56,1	55,2	s. Graph	50	50	50	50
β (MB) (mg mL ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β (NAD) (mg mL ⁻¹)	4,21	4,21	4,21	4,21	4,21	-	-	-	-	-
Cyanidase (nkat mL ⁻¹)	49	95–108	85	86	68	-	244	-	-	-
FDH (nkat mL ⁻¹)	262	262	262	262	258	-	-	-	-	-
zusätzliche Bestandteile?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elektrode										
Elektrodentyp	W5	W5	W5	W5	W5	W2/ PB/PPY	W2/ PB/PPY	W2	W5	W5
V(Mischung) auf Chip (μL)	2	2	2	2	2	4	4	4	4	4
Potential (V)	0,1	-0,2	-0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3/0,1
Gasraum										
Säure	H ₃ PO ₄ 1M	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	s. Graph	H ₃ PO ₄ 1M/ Glycerol 1/3	H ₃ PO ₄ 1M/ Glycerol 1/3	H ₃ PO ₄ 1M/ Glycerol 1/3	H ₃ PO ₄ 1M/ Glycerol 1/3
V(Säure) (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V(Gasraum) (mL)	500	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500	500
Sonstige Bedingungen										
Wasserbad (°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luft gerührt	-	ja	ja	ja	-	-	-	-	-	-

	②1	②2	②3	②4	②5	②6	②7	②8
Mischung								
% Glycerol (V/V)	50	50	50	44,4	43,2	43,2	43,2	43,2
β (MB) (mg mL ⁻¹)	-	-	-	-	0,57	0,57	-	-
β (NAD) (mg mL ⁻¹)	-	-	-	2,2	2,2	2,2	2,5	2,2
Cyanidase (nkat mL ⁻¹)	420	405	(407)	(86)	(75)	(61)	(85)	(75)
FDH (nkat mL ⁻¹)	-	-	-	933,3	908	908	908	908
zusätzliche Bestandteile?	-	-	-	-	-	-	K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆] 13 mM
Elektrode								
Elektrodentyp	W2	W2	W2	W4	W5	W5	W4	W4
V(Mischung) auf Chip (μL)	2	2	2	5	5	5	5	5
Potential (V)	0,3	0,3	0,3	0,8	0,1	0,1	0,55	0,3
Gasraum								
Säure	Citronensäure wasserfrei	Citronensäure wasserfrei + CaCl ₂	H ₂ SO ₄ / Glycerol (1/1)	H ₂ SO ₄ / Glycerol (0,78/1)	H ₂ SO ₄ / Glycerol (0,78/1)	H ₂ SO ₄ / Glycerol (0,78/1)	H ₂ SO ₄ / Glycerol (0,78/1)	H ₂ SO ₄ / Glycerol (0,78/1)
V(Säure) (mL)	3 g	je 3 g	60	1	1	1	1	1
V(Gasraum) (mL)	500	500	440	1000	1000	1000	1000	1000
Sonstige Bedingungen								
Wasserbad (°C)	-	-	-	-	-	-	-	-
Luft gerührt	-	-	-	-	-	-	-	-

4 Diskussion

4.1 Am Sensoraufbau beteiligte Enzyme

4.1.1 Cyanidase

Auch wenn die gewählte Methode zur Expression und Aufreinigung der Cyanidase in einigen Parametern wie IPTG-Konzentration, Zeitpunkt der IPTG-Zugabe, Dauer der Inkubation nach IPTG-Zugabe usw. optimiert werden könnte, waren sowohl Ausbeute als auch Reinheit sehr zufriedenstellend. Wie in Abbildung 3.8 auf Seite 78 zu sehen ist, sind in der nach dem beschriebenen Protokoll gewonnenen Cyanidase-Lösung kaum Verunreinigungen enthalten. Mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 10 mL Lösung mit einem mittleren Proteingehalt von $6,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ kann die Expression als unproblematisch angesehen werden. Durch das enthaltene Imidazol ergibt sich bei der Proteingehaltsbestimmung nach Lowry ein um ca. 5–10 % zu niedriger Gehalt. Es konnte aber durch Trocknen und Auswiegen einer dialysierten Lösung gezeigt werden, dass die Methode nach Lowry in Kombination mit BSA als Referenz grundsätzlich geeignet ist, den Proteingehalt einer Cyanidase-Lösung zu quantifizieren. Der durch Imidazol bedingte Fehler ließe sich durch ein Standardzumischverfahren unter Zugabe unterschiedlicher Imidazol-Mengen korrigieren. Dies wurde bei dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die hochpräzise Kenntnis der Proteinmenge für die Entwicklung eines Sensors unerheblich ist.

Die Enzymaktivität dagegen ist für enzymatische Sensoren von entscheidender Bedeutung. Die bereits zuvor in einer Diplomarbeit ermittelten enzymkinetischen Parameter konnten lediglich im Bezug auf K_M , aber nicht auf v_{\max} reproduziert werden. Die Bestimmung dieser Parameter für die verwendete Cyanidase war, wie besonders in Abbildung 3.4 auf Seite 74 zu sehen ist, nicht sehr genau. Dennoch kann gesagt werden, dass die Aktivität mit einem Wert für v_{\max} zwischen 132 und $268 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$ signifikant niedriger lag als die noch von Kuhrmeyer gefundenen Werte zwischen 729 und $905 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eventuell ist eine Mutation im Cyanidase-Gen für diese erniedrigte Aktivität verantwortlich. Auch im Vergleich zu anderen nativen sowie rekombinant hergestellten Proteinen war die Cyanidase-Aktivität sehr niedrig. Wie in Tabelle 1.1 auf Seite 33 aufgeführt, liegen in der Literatur beschriebene Werte für v_{\max} bzw. die spezifische Aktivität im Bereich zwischen 910 und $1667 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Vom Aufwand einer erneuten Konstruktion eines Plasmids wurde abgesehen, da das primäre Ziel der Arbeit kein vermarktungsfähiger Sensor war, sondern der Beweis der Eignung des zugrunde liegenden Messprinzips für die Bestimmung von Cyanid. Die vorhandene Aktivität der Cyanidase wurde dafür als ausreichend erachtet. Gegenstand

näherer Betrachtungen war jedoch die Abnahme der Aktivität während der Lagerung des Enzyms, die einer Reaktionskinetik erster Ordnung folgte. Obwohl sich die verwendete Cyanidase bei Lagerung im KS mit ungefähr 35 Tagen im Vergleich zum einzigen für die Halbwertszeit verfügbaren Literaturwert von 11 Tagen [BKPB92] als stabiler herausstellte, wurde dieser Punkt genauer untersucht. Nachdem ein durch Proteasen verursachter Abbau des Proteins ausgeschlossen werden konnte (Kapitel 3.1.5), wurde Denaturierung als Grund für den Abfall der Enzymaktivität angenommen. Allerdings waren die kompatiblen Solute Ectoin, Hydroxyectoin und Saccharose nicht in der Lage, die Denaturierung aufzuhalten, wie Abbildung 3.7 auf Seite 77 zeigt. Da mikrobieller Befall offensichtlich keine Rolle spielte, konnte auch Natriumazid als Konservierungsmittel den Abfall der Aktivität bei Lagerung im KS nicht verhindern. Die scheinbare Erhöhung der initialen Aktivität durch Azid ist höchstwahrscheinlich auf eine Störung des Lowry-Assays zur Proteingehaltsbestimmung zurückzuführen, da die in Abbildung 3.7 aufgetragenen Aktivitäten auf die Proteinmengen in den jeweiligen Cyanidase-Lösungen bezogen sind. Die mit Azid versetzte und im GS gelagerte Lösung zeigte im Lowry-Assay einen um 16 % niedrigeren Proteingehalt als die im GS gelagerte Lösung mit Ectoin und Hydroxyectoin. Aufgrund der Einwaage von insgesamt 90 mg Ectoin und Hydroxyectoin gegenüber 0,8 mg Natriumazid sollte eigentlich die Ectoin-haltige Lösung einen niedrigeren Proteingehalt aufweisen. Für die Bewertung des Lagerversuchs ist also nicht die absolute Aktivität, sondern der Abfall der Aktivität bezogen auf den Initialwert der jeweiligen Lösung heranzuziehen.

Hier zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Stabilität durch Lagerung unterhalb des Gefrierpunkts. Die Konservierung der Aktivität auf ihrem Ursprungsniveau, die beim Lagerversuch mit verschiedenen Zusätzen beobachtet wurde, konnte in einem Folgeversuch mit einer im GS gelagerten Cyanidase-Lösung nicht reproduziert werden. Mit einer Halbwertszeit von 87 Tagen wurde dennoch eine mehr als doppelt so hohe Stabilität verglichen zur Lagerung im KS erhalten. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die nochmals höhere Stabilität bei Lagerung mit Zusätzen durch einen dieser Zusätze hervorgerufen wurde, da die Konservierung der Aktivität bei allen Zusätzen sowie bei lediglich steriltfiltrierter Lösung zu beobachten war.

Es war jedoch in der Folge meist nicht möglich, Cyanidase-Lösungen im GS zu lagern, da in fast allen Fällen Protein ausfiel und nach dem Auftauen keine Aktivität mehr vorhanden war. Da keine bewusste Änderung des Expressions- und Aufreinigungsprotokolls, inklusive der verwendeten Puffer, vorgenommen worden war, bleibt die Ursache unklar. Möglicherweise war die verwendete Nickelsäule beschädigt, wodurch Spuren von Trägermaterial zusammen mit gebundenem Nickel in die Lösung gelangten und Kristallisationskeime bildeten. Dies ist aber als vage Vermutung anzusehen.

Die Lagerstabilität der Cyanidase-Lösungen erwies sich allerdings nur im Bezug auf den Arbeitsaufwand zur Entwicklung eines Gassensors als relevant, da hierfür ständig aktive Cyanidase vorgehalten werden musste. Die Mischungen zum Aufbringen auf die Elektrodenchips wurden täglich frisch hergestellt, so dass eine Stabilisierung

der im Sensor enthaltenen Cyanidase-Aktivität in dieser Stufe der Entwicklung nicht notwendig war. Im Hinblick auf einen praktikablen Biosensor zur Messung von Blausäure in der Gasphase besteht hier gleichwohl Handlungsbedarf. So könnten weitere kompatible Solute getestet werden. Weiterhin sollte darauf hingearbeitet werden, ein Einfrieren der Enzymlösung zu ermöglichen. Wie in nachfolgenden Kapiteln gezeigt wird, sind indes bis zur erfolgreichen Demonstration eines reproduzierbaren, praktikablen Gassensors auf Enzymbasis noch schwerwiegendere Probleme zu lösen.

Für den Durchflusssensor gelang die Stabilisierung auf anderem Wege. Die Immobilisierung der Cyanidase in Kartuschen mit NHS-aktivierter Sepharose bewirkte einen weitgehenden Erhalt der Aktivität, so dass die Umsatzrate einer Kartusche von initial 80 % nach 104 Tagen noch mit 43 % bestimmt wurde. Mit dieser Kartusche waren zudem auch noch Messungen möglich, so dass das Problem der Stabilität im Falle des Durchflusssensors als hinreichend gelöst gelten kann. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der Immobilisierung vielfach als geeignetes Mittel zur Stabilisierung von Enzymen beschrieben ist, so z. B. von Mateo et al. [MPFL⁺07].

4.1.2 Formiatdehydrogenase

Die für diese Arbeit gewählte, kommerziell erhältliche FDH zeigte eine über Jahre konstante und auch bei relativ niedrigen Konzentrationen des Cosubstrats NAD⁺ ausreichende Aktivität. Ebenso erfolgte durch Cyanid keine Inhibition. Dies zeigt sich an etwa gleichen Peakhöhen von Cyanid- und Formiat-Injektionen im Bezug auf NADH-Injektionen, beispielsweise in den Abbildungen 3.25 (Seite 94) und 3.36 (Seite 102). Da auch die Immobilisierung an NHS-aktivierte Sepharose problemlos gelang, waren in keiner Hinsicht weitere Anstrengungen notwendig.

4.2 Enzymatischer Sensor mit Detektion von Formiat

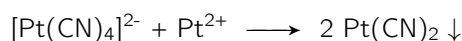
Die Detektion von Formiat nach der Umsetzung von Cyanid durch Cyanidase stellt den einfachsten Fall eines Bio- bzw. enzymatischen Sensors für Cyanid dar. Hier ist nur ein Enzym am Sensoraufbau beteiligt, das außer Wasser auch keine weiteren Cosubstrate benötigt. Wie die Experimente in Kapitel 3.3.1 zeigen, ist eine Pt-WE des Elektrodentyps W2 zur Erfassung von Formiat in der Lage, während aus Abbildung 3.15 auf Seite 84 hervorgeht, dass der Elektrodentyp W5 zumindest bei 0,3 V nicht auf Formiat reagiert. Ebenso zeigt Abbildung 3.26 auf Seite 95 (Teil (c): ohne FDH-Kartusche), dass Formiat bei Einsatz des Elektrodentyps W4 selbst bei einem Potential von 0,8 V nicht oxidiert wird.

Die Möglichkeit, Formiat mit Hilfe einer Pt-WE direkt zu detektieren, war insofern überraschend, als zunächst aufgrund einer Arbeit von Zhao et al. [ZYAW02] davon ausgegangen wurde, die Detektion über eine chemische Modifizierung der WE mittels PB kombiniert mit einem biosensorischen Aufbau (Einschluss von FDH und NAD⁺ in einen Film von PPY) realisieren zu müssen. Die Messreihen in Kapitel 3.3.1

ergaben aber, dass außer der reinen WE keine einzige der Komponenten für die Detektion notwendig war, auch nicht die chemische Modifizierung mit PB. An diesem Beispiel wird die Bedeutung von Kontrollexperimenten deutlich. Zur zumindest teilweisen Ehrenrettung von Zhao et al. sei erwähnt, dass in der fraglichen Veröffentlichung hauptsächlich die Details der Bildung eines PB-Films untersucht wurden und es sich bei der Konstruktion des Biosensors um eine Zusatzarbeit handelte. Weiterhin zeigt sich an diesem Beispiel die Bedeutung einer ausführlichen Literaturrecherche, da die Oxidation von Ameisensäure an Pt-WE schon länger bekannt ist. Beispielsweise veröffentlichten Kita, Katagiri und Kunitatsu [KKK87] entsprechende Ergebnisse, die auch dem Autor der vorliegenden Arbeit zunächst verborgen blieben.

Dennoch gelang es nicht, einen Ein-Enzym-Sensor zu konstruieren, da Pt-WE von Cyanid angegriffen werden. Der Mechanismus wurde bereits in Kapitel 3.3.1 ab Seite 81 besprochen. Die durch Cyanid hervorgerufene Signalverfälschung war auch bei im Vergleich zu Formiat hundertfach niedriger konzentriertem Cyanid noch in für die Formiatbestimmung relevanter Größenordnung vorhanden (Abbildung 3.17). Die Cyanidase-Kartuschen, die für diesen Durchflusssensor zum Einsatz kommen sollten, besaßen Umsatzraten von maximal 80 % (Kapitel 3.4.3), so dass Proben auch nach Durchlaufen der Cyanidase-Kartusche noch erhebliche Mengen an Cyanid aufwiesen.

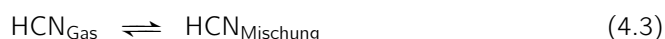
Die Entfernung von Cyanid aus dem Durchflusssystem mittels Komplexbildung gelang nicht in ausreichendem Maße. Mit allen vier untersuchten Metallionen wurden erhöhte Stromsignale gemessen, wenn die Probe Cyanid enthielt (Kapitel 3.3.3). Im Falle von Co^{2+} und Ni^{2+} wurden extrem hohe Strompeaks beobachtet (Abbildung 3.20 sowie Abbildung 3.20 ab Seite 89). Dies könnte zwei Ursachen haben. Zum einen wäre denkbar, dass die genannten Metallionen im an die Säule gebundenen Zustand nicht in der Lage waren, Cyanid vollständig aus der Probe zu entfernen. Plausibel erscheint auch die Erklärung, dass die Metallionen durch Bildung der Cyanidokomplexe von der NTA-Matrix der Säulen abgelöst wurden und die Komplexe mit der Elektrode in Kontakt kamen. Da der Cyanidokomplex von Pt^{2+} eine wesentlich höhere Komplexbildungskonstante besitzt als der von Co^{2+} und Ni^{2+} (Tabelle 3.5 auf Seite 87), könnte die Reaktion von Cyanid mit Pt^{2+} durch Ni^{2+} und Co^{2+} nicht verhindert werden. Beide Erklärungen können auch zur Deutung der erhöhten Peaks im Falle einer vorgeschalteten Säule mit Pt^{2+} herangezogen werden. Wie zuvor könnte hier nicht komplexiertes Cyanid an die Elektrode gelangt sein. Zudem könnte, nachdem Pt^{2+} als Tetracyanidokomplex von der NTA-Säule abgelöst wurde, überschüssiges Pt^{2+} an der Elektrode zur Bildung von schwer löslichem $\text{Pt}(\text{CN})_2$ geführt haben:



Mit Pd^{2+} hingegen traten lediglich schwach erhöhte Peaks auf, wenn der Analyse Cyanid beigemischt war (Abbildung 3.19). Möglich wäre auch hier, dass ein sehr geringer Teil der Cyanidionen nicht von der Pd-Säule zurückgehalten wurde. Da sich aber die Elektrode braun verfärbte, kann als wahrscheinlich angesehen werden, dass Pd^{2+} von der Säule abgelöst wurde und als $[\text{Pd}(\text{CN})_4]^{2-}$ zur Elektrode gelangte. Die Erhöhung

der Stromstärke ist aufgrund der wesentlich höheren Komplexbildungskonstanten für Tetracyanidopalladat im Gegensatz zu Tetracyanidoplatinat wahrscheinlich nicht auf Cyanid selbst zurückzuführen, sondern könnte durch eine Oxidation von Pd^{2+} zu Pd^{4+} hervorgerufen worden sein.

Das starke Stromsignal bei Pt-WE, das mit Cyanid bei Durchflussmessungen erhalten wurde, konnte bei Messungen im Gasraum mit den auf Seite 67 dargestellten Aufbauten nicht beobachtet werden. Hier war erwartet worden, dass sich ein mehrstufiges Gleichgewicht nach den Gleichungen 4.1 bis 4.3 ausbildet, wodurch Cyanid nach Zugabe in die Säure schließlich in die Mischung gelangt, welche die Elektroden bedeckt:



Eine Pt-WE sollte nun mit einer Stromzunahme reagieren, hervorgerufen analog den Durchflussmessungen durch Cyanid oder auch durch Formiat, falls die Mischung Cyanidase enthält und diese in der Lage ist, das Cyanid schnell genug abzubauen.

Messungen mit einer PB-PPY-modifizierten bzw. einer reinen Pt-WE zeigten jedoch im Vergleich zu Wasser- bzw. Natronlaugezugaben meist keine höhere Reaktion des Messsystems auf Zugaben, die Cyanid enthielten (Abbildungen 3.74 und 3.75 ab Seite 137). Lediglich bei einer Messung waren höhere Signale bei Cyanidzugaben zu verzeichnen (Abbildung 3.82 auf Seite 144), die allerdings wesentlich niedriger als die im Durchfluss erhaltenen Peaks waren. Zudem zeigte eine Kohlenstoff-WE im Gasraum das gleiche Verhalten wie Pt-WE (Abbildung 3.76), während im Durchfluss ein stark abweichendes Verhalten beobachtet worden war (Abbildung 3.15 auf Seite 84). Hierbei sind zwei Aspekte zu klären, einerseits die erwartete, aber meist nicht vorhandene Reaktion auf Cyanid und andererseits die unerwartete Reaktion auf Zugaben von Wasser und verdünnte Natronlauge.

4.3 Verhalten von Elektrodenchips im Gasraum

4.3.1 Allgemeine Betrachtungen

Abgesehen von den hintereinander geschalteten Gleichgewichten 4.1 bis 4.3, durch die Cyanid von der Säure am Boden der Apparatur in die Mischung auf den Elektrodenchips gelangen sollte, sind noch weitere Vorgänge zu betrachten. So bilden sowohl die Säurekomponente als auch die Mischung auf dem Chip einen bestimmten Wasserdampfdruck aus. Sind Osmolarität und Temperatur beider Komponenten gleich, führt dies langfristig zum Erreichen des Sättigungsdampfdrucks, wobei beide Komponenten ihr Volumen beibehalten. Unterscheiden sich aber die beiden Flüssigkeiten bezüglich Osmolarität und/oder Temperatur, verdunstet Wasser von der Komponente mit dem

höheren Dampfdruck, während an der anderen Komponente Wasser kondensiert, bis beide Komponenten den gleichen Dampfdruck besitzen.

Diese Vorgänge sind auch bei Zugaben in die Säurekomponente zu berücksichtigen, sofern die Osmolarität der zugegebenen Lösung nicht mit der der Säurekomponenten übereinstimmt. Bei 0,2 N Schwefelsäure oder 1 M Phosphorsäure, die zudem noch mit Glycerol vermischt waren, war die Osmolarität der Säurekomponente in allen Fällen höher als die der Zugaben, die meist aus Cyanid im submillimolaren Bereich, gelöst in 30 mM Natronlauge, bestanden. Durch diese Verdünnung erhöhte sich der Wasserdampfdruck der Säurekomponente. Des Weiteren bewirkt z. B. die Zugabe von in Natronlauge gelöstem Cyanid in die Säure durch eine exotherme Säure-Base-Reaktion eine Erhöhung der Temperatur der Säurekomponente, was ebenfalls zu einer Erhöhung des Wasserdampfdrucks dieser Komponente führt.

In der Folge verändert sich das Verhältnis der Dampfdrücke der Säurekomponente und der Mischung auf den Elektroden. Sollten beide zuvor gleich gewesen sein, wird nun Wasser in die Mischung kondensieren. Dadurch bedingt findet eine Verdünnung der Mischung statt. Dies hat Einfluss auf zwei elektrochemische Vorgänge, die sich bezüglich des an der WE gemessenen Stroms gegenläufig verhalten. Zum einen werden Verunreinigungen, die einen großen Anteil am Grundstrom bzw. der Basislinie haben, verdünnt, was eine Erniedrigung des faradayschen Grundstroms zur Folge hat. Zum anderen aber verändert sich die Konzentration von Chlorid. Dies bewirkt eine Verschiebung des Potentials der RE, da diese bei den vorliegenden Elektrodenchips nicht mit einer eigenen, durch ein Diaphragma von der übrigen Lösung abgetrennten KCl-Lösung versehen ist. Vielmehr wird das absolute Potential der RE durch die Chloridkonzentration in der Mischung bestimmt. Ändert sich diese Konzentration, ändert sich auch das Potential der RE. Diese Verschiebung kann berechnet werden, wenn man die auf die Silber-Silberchlorid-RE bezogene Form der Nernst-Gleichung (Gleichung 1.6 auf Seite 17) um einen Verdünnungsfaktor f erweitert:

$$E = E_{\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-}^0 - 0,059 \text{ V} \cdot \lg(f \cdot c(\text{Cl}^-)) \quad (4.4)$$

Durch Umstellen des rechten Terms nach den Logarithmenregeln kann ein neuer Term gebildet werden, der den Einfluss des Verdünnungsfaktors angibt:

$$\Delta E = -0,059 \text{ V} \cdot \lg f \quad (4.5)$$

Bei einer Volumenzunahme der Mischung auf das Doppelte ($f = 0,5$) verändert sich somit das Potential der RE um +0,01776 V. Da das an der WE angelegte Potential auf die RE bezogen ist, ändert sich das absolute Potential der WE um den gleichen Betrag. Bei einer Potentialänderung ändert sich die Ladungsdichte der elektrolytischen Doppelschicht an der Oberfläche der WE, wodurch ein kapazitiver Strom fließt. Dieser klingt jedoch nach vollständiger Ausbildung der neuen Doppelschicht wieder ab, wohingegen der faradaysche Strom, der wie bereits oben beschrieben auch durch Verunreinigungen zustande kommt, durch die Potentialerhöhung langfristig zunimmt. Somit ist der faradaysche Strom einerseits einem erniedrigenden Effekt durch der

Verdünnung der Lösung und andererseits einem erhöhenden Effekt durch Potentialerhöhung ausgesetzt; zusätzlich fließt kurzfristig ein kapazitiver Strom.

Die Faktoren in ihrer Summe können als Erklärung für die allgemeine Stromerhöhung dienen, die bei Messungen mit 0,3 V nach Zugaben von Flüssigkeitsvolumina mit niedrigerer Osmolarität beobachtet wurde. Der Anteil des kapazitiven Stroms, der zunächst ansteigt und nach einer gewissen Zeit wieder abfällt, könnte der Grund für den Abfall des Signals sein, der bei vielen Messungen nach anfänglichen Anstiegen beobachtet wurde. Das in Abbildung 3.81 auf Seite 143 beobachtete Verhalten des Systems bei wesentlich höherem Säurevolumen (30 mL H_2SO_4 + 30 mL Glycerol) steht damit im Einklang. Ein höheres Volumen in runden Kolben bedingt zumindest bis zur Hälfte des Kolbenvolumens eine größere Flüssigkeitsoberfläche, wodurch sich zwar der Sättigungsdampfdruck nicht ändert, wohl aber die Geschwindigkeit, mit der sich dieser einstellt. Die im Vergleich zu anderen Versuchen stark ansteigende Stromstärke, die Werte über 350 nA erreichte, könnte durch diese höhere Verdunstungsgeschwindigkeit von Wasser aus der Säurekomponente verursacht sein. Eine elektrochemische Reaktion von eventuell vorhandenen Verunreinigungen auf der Elektrodenoberfläche erscheint unwahrscheinlich, da in den Abbildungen 3.72 und 3.73 (Seite 136) ebenfalls ein starker Anstieg der Stromstärke beobachtet wurde, der aber zum Erliegen kam, wenn die Elektrode aus dem Kolben genommen wurde. Die Zugaben von relativ geringen Volumina Wasser (30 μL) in ein großes Volumen Säurekomponente sollten eine im Vergleich zu kleineren Säurevolumina niedrigere Änderungen des Wasserdampfdrucks bewirken. Diese könnten sich aber durch die größere Oberfläche schneller auf das Gesamtsystem auswirken.

Die bei der in Abbildung 3.81 gezeigten Messung ebenfalls beobachtete Korrelation der Temperatur mit dem Sensorsignal wurde bislang nicht in die Überlegungen einbezogen. Zu beachten ist, dass zwar eine allgemeine Korrelation vorliegen könnte, die sich aber nicht im Bezug auf Wasserzugaben zeigt. Verdünnte Schwefelsäure (0,2 N) sollte vollständig deprotoniert sein; daher kann angenommen werden, dass Wasserzugaben keine weitere Temperaturerhöhung bewirken. Dies würde erklären, weshalb lediglich die Stromkurve, aber nicht die Temperaturkurve auf Wasserzugaben reagiert. Insgesamt muss dennoch zusätzlich zu den Überlegungen zur Abhängigkeit des Sensorsignals vom Dampfdruck auch eine Abhängigkeit von der Temperatur in Betracht gezogen werden. Die Versuche mit abwechselnder Positionierung des Elektrodenchips im Kolben und in Raumluft (Abbildungen 3.72 und 3.73 auf Seite 136) lassen allerdings den Schluss zu, dass der Dampfdruck eine wesentlich größere Rolle spielt, da die Fluktuation der Stromstärke um Größenordnungen kleiner war, wenn die Komponente am Boden des Kolbens durch den Zusatz von Glycerol einen erniedrigten Dampfdruck besaß.

Der Ansatz, dennoch die Temperatur mittels eines thermostatisierten Wasserbads zu kontrollieren, wurde nach einigen Versuchen wieder fallen gelassen, da fast ausschließlich die Temperatur der Säurekomponente direkt beeinflusst wurde, die des Elektrodenchips aber nicht. Zudem beschlug der Teil des Kolbens oberhalb der Ober-

fläche des Wasserbads bei den gewählten Temperaturen von 25°C. Die Raumtemperatur lag bei geschätzten 20–23°C.

Die Überlegungen bezüglich Dampfdruck und Temperatur liefern aber keine Erklärung für die ausbleibende bzw. geringe Reaktion auf Cyanid, insbesondere bei Einsatz von Pt-WE. Eine Stoffmenge von 10 nmol in 100 µL, gemessen im Durchfluss, reichte aus, um bei Pt-WE ein deutliches Signal hervorzurufen (Abbildung 3.17 auf Seite 85). 30 nmol Cyanid waren bei Messungen im Gasraum mit einer Pt-WE, modifiziert mit PB und PPY, aber nicht in der Lage, ein Stromsignal über die allgemein bei Flüssigkeitszugaben beobachtete Größenordnung hinaus zu bewirken (Abbildung 3.74 auf Seite 137). Die Argumentation, dass die Modifikation der WE durch PB und PPY die Elektrode unempfindlich gegenüber Cyanid macht, wird durch die in Abbildung 3.12 auf Seite 82 dargestellte Messung widerlegt, in der eine PB-PPY-modifizierte Elektrode in gerührter Flüssigkeit deutlich auf Cyanid reagiert.

Somit bleibt als Erklärung lediglich, dass Cyanid bei vielen Versuchen nicht in genügender Menge oder Geschwindigkeit zur Mischung auf dem Chip gelangte. Die Protonierung sowie die Verdunstung der Blausäure in den Gasraum benötigt allerdings, wie die Versuche zur Ermittlung der Henry-Konstanten in Kapitel 3.5.2 zeigen, weniger als 1800 s. Die Zeit, die die Blausäure zum Durchqueren des Gasraums und Lösen in der Mischung benötigt, scheidet als Ursache der fehlenden Sensorantwort gleichermaßen aus, da Wasser die gleiche Zeit benötigen sollte, um zur Mischung zu gelangen. Nach dem Gesetz von Henry tritt nur ein Teil der Blausäure aus der Gasphase in die Mischung über. Dies gilt aber nur, sofern die Blausäure in Lösung dem Gleichgewicht nicht durch Deprotonierung oder sonstige Folgereaktionen entzogen wird. Da aber von einem Ausfällen von Platincyanid ausgegangen wird, das der Mischung Cyanid entzieht, sollte auf diese Weise sämtliche Blausäure in die Mischung gelangen. Warum dies nicht bzw. nicht schnell genug geschieht, entzieht sich dem Verständnis des Autors.

Ebenso sieht sich der Autor nicht in der Lage, das durch die Stellung des Elektrodenchips bedingte unterschiedliche Verhalten, wie es in Abbildung 3.54 auf Seite 122 gezeigt ist, zu erklären. Eine Kontaktaufnahme mit der Firma BVT brachte in Erfahrung, dass jener ebenfalls das Phänomen, aber nicht die Ursache bekannt ist. Versuche, die Form des Mischungstropfens auf den Chips durch Papier (Kapitel 3.5.5) bzw. durch Immobilisierung der Mischung unter einer Dialysemembran (Kapitel 3.5.6) reproduzierbar zu gestalten, verliefen unbefriedigend. Stromstufen, die nach Cyanidzugaben bei mit Papier fixierter Mischung erhalten wurden, waren entweder nicht stabil (Abbildung 3.55, Seite 123) oder kaum vorhanden (Abbildung 3.56). Denkbar wäre, dass das Papier eine zu große Diffusionsbarriere für Cyanid bzw. die Folgeprodukte aus der Enzymkaskade darstellt. Ebenso könnte eine austrocknende Dialysemembran, wie sie bei allen Versuchen des Kapitels 3.5.6 beobachtet wurde, eine sich langsam aufbauende Diffusionsbarriere darstellen. Dies würde den langsameren Anstieg der Peaks bei wiederholter Vermessung gleicher Cyanidstoffmengen erklären.

4.3.2 Detektion von Cyanid über Enzymkaskade und Mediator

Trotz der Reaktion der Elektrodenchips im Gasraum auf Flüssigkeitszugaben in die Säurekomponente sowie den Überlegungen des vorangegangenen Kapitels gibt es starke Hinweise, dass zumindest bei manchen Messungen mit dem im Kapitel 3.5 beschriebenen Gassensor tatsächlich Signale durch Cyanid hervorgerufen wurden. Bei den in Abbildung 3.48 auf Seite 117 gezeigten Kontrollexperimenten, wobei jeweils eine der an der Enzymkaskade beteiligten Komponenten in der Mischung fehlte, trat keine Reaktion auf Cyanid enthaltende Flüssigkeitszugaben in die Säure auf. Bei Mischungen mit kompletter Enzym-, Cosubstrat- und Mediatorzusammensetzung dagegen war ein deutliches Stromsignal zu verzeichnen, das eindeutig mit der zugegebenen Stoffmenge an Cyanid korreliert, aber nicht mit der zugegebenen Flüssigkeitsmenge. In Abbildung 3.49 ist bei Zugabe von 1 nmol Cyanid in 25 μ L Natronlauge (30 mM) eine Stufe von ca. 0,02 nA zu erkennen, während die nachfolgende Zugabe von 45 nmol Cyanid in 30 μ L Natronlauge eine Stufe von ca. 4,3 nA bewirkte. In ähnlicher Weise zeigt Abbildung 3.51 auf Seite 119 eine Stromstufe von ca. 0,01 nA bei Zugabe von 1 nmol Cyanid in 25 μ L Natronlauge sowie zwei Stufen von ca. 0,49 nA als Reaktion auf 10 nmol Cyanid in 25 μ L Natronlauge. Zwar ist kein linearer Zusammenhang zwischen der Erhöhung des Stroms und der zugegebenen Cyanidmenge vorhanden, jedoch wurde bei wesentlich höherer Cyanidmenge in nahezu konstantem Volumen auch ein wesentlich höheres Signal gemessen.

Zu beachten ist, dass die beiden Messungen jeweils mit verdünnter Schwefelsäure ohne Glycerolzusatz durchgeführt worden waren. Wie auf Seite 120 beschrieben, war der Zusatz von Glycerol bei nachfolgenden Messungen vorgenommen worden, weil ohne Glycerol eine starke Volumenzunahme der Mischung auf den Elektrodenchips beobachtet worden war. Diese trat nach Zusatz von Glycerol zur Säurekomponente in dieser Größenordnung nicht mehr auf. Die im vorangegangenen Kapitel erläuterten Vorgänge bei Verdünnung der Mischung sollten umso stärker auftreten, je höher der Wasserdampfdruck der Säurekomponente ist. Andererseits wäre die Verdünnung der Mischung auf den Chips bei niedriger Osmolarität der Säurekomponente ein Vorgang, der relativ gleichmäßig über die Zeit stattfinden sollte. Bei höherer Osmolarität der Säurekomponente wäre zunächst ein niedrigerer Wasserdampfdruck vorhanden, der bei ausbleibenden Zugaben eine geringere Volumenzunahme der glycerolhaltigen Mischung bewirken würde. Zugaben von Flüssigkeiten mit niedriger Osmolarität würden aber eine höhere Änderung des Wasserdampfdrucks von glycerolhaltigen im Vergleich zu glycerolfreien Säurekomponenten bewirken. Somit könnte sich der Zusatz von Glycerol zur Kontrolle des Wasserdampfdrucks der Säurekomponente als kontraproduktiv erwiesen haben.

Diese Theorie wird durch die Ergebnisse zweier Versuche unterstützt, die sich lediglich in der Zusammensetzung der Säurekomponente sowie nur sehr gering bezüglich der in der Mischung enthaltenen Cyanidase-Aktivität unterscheiden. Die Stromstufen in Abbildung 3.52 auf Seite 121, erhalten mit verdünnter Schwefelsäure ohne Glycerolzusatz, haben eine mittlere Höhe von ca. 0,155 nA. Mit dem Zusatz von Glycerol

in die Säure, wie in der nachfolgenden Messung geschehen (Abbildung 3.53), wurden Stufen in vierfacher Höhe (0,6 nA) gemessen.

Allerdings sind Schlussfolgerungen aus dem Vergleich von nur zwei Versuchen als unzulässig zu betrachten, da die in Kapitel 3.5.13 beschriebenen Versuche mit zwei gleichzeitig im selben Kolben vorhandenen Elektrodenchips unter gleichen Bedingungen Sensogramme mit um Größenordnungen verschiedenen Stromsignalen ergaben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die Mischung nur jeweils eines Chips Cyanidase enthielt. Die Sensogramme mit weitaus niedrigeren Stromstärken in den Abbildungen 3.83, 3.86 und 3.89 ab Seite 146 stammen vom Chip mit Cyanidase, wohingegen die Sensogramme mit niedrigeren Stromstärken in den Abbildungen 3.84 und 3.85 dem Chip ohne Cyanidase zugeordnet sind. Lediglich bei einer Messung (Abbildung 3.88) bewegten sich sowohl das Sensogramm des Chips mit als auch das Sensogramm des Chips ohne Cyanidase in der gleichen Größenordnung. Die Höhe der Signale, ob nun auf Zugaben mit oder ohne Cyanid, ist dementsprechend mit dem untersuchten Aufbau nicht reproduzierbar. Dadurch verliert die Messung der Höhe der durch cyanidfreie Zugaben verursachten Signale bei verschiedenen Potentialen (Abbildung 3.77 auf Seite 140) an Aussagekraft, obwohl es weiterhin als wahrscheinlich angesehen wird, dass die Höhe des Signals auf Wasserzugaben auch vom Potential abhängig ist. Ebenso ist es nicht möglich, mittels eines Blindchips den durch Cyanid verursachten Anteil am Gesamtsignal zu bestimmen.

Einige Messungen des Kapitels 3.5.4 sowie alle Messungen der Kapitel 3.5.5 bis 3.5.8 wurden ohne Kontrollen durch cyanidfreie Flüssigkeitszugaben durchgeführt. Dies erlaubt nur eine spekulative Beurteilung, ob die erhaltenen Signale durch Cyanid oder durch die bereits diskutierten Vorgänge im Zusammenhang mit dem Wasserdampfdruck entstanden. Die Kritik an diesem Versäumnis ist sicherlich berechtigt, vor allem nachdem der Autor fehlende Kontrollexperimente in einer Veröffentlichung von Zhao et al. bemängelte. Als Erklärung sei angeführt, dass ein Signal allein verursacht durch Wasser nach den zahlreichen, in Abbildung 3.48 auf Seite 117 gezeigten Messungen (unvollständige Mischungen zur Kontrolle des Messprinzips) nicht erwartet wurde.

Betrachtet man jedoch die Messungen, bei denen Zugaben sowohl ohne als auch mit Cyanid vorgenommen wurden, so entsprach zunächst der Einsatz von fester Säure (Kapitel 3.5.11) nicht den Erwartungen. Beim Einsatz von wasserfreier Citronensäure (Abbildung 3.78 auf Seite 141) wurden etwa gleich hohe Stromstufen auf Zugaben von Natronlauge mit und ohne Cyanid erhalten. Das Signal bei cyanidfreien Zugaben kann wiederum auf den Dampfdruck zurückzuführen sein, da auch Kristallwasser einen solchen ausbildet. Mit beigemischtem getrockneten CaCl_2 , das Wasser sehr stark bindet, konnte weder auf cyanidfreie noch auf cyanidhaltige Zugaben ein Stromsignal beobachtet werden (Abbildungen 3.79 und 3.80, Seite 142). Warum sowohl mit als auch ohne CaCl_2 kein Signal auf Cyanid erhalten wurde, ist unklar. Citronensäure sollte mit einem pK_S von 3,1 in der Lage sein, Blausäure freizusetzen. Calciumcyanid ist leicht löslich; ein Cyanidokomplex des Calciums ist in der Literatur nicht beschrieben.

Eventuell traten ähnliche Probleme auf wie bei den zuvor besprochenen Messungen mit Pt-WE in der Gasphase, bei denen sich auf Cyanidzugaben nicht das erwartete Signal zeigte. Eine abschließende Bewertung einer Mischung aus Citronensäure und getrocknetem CaCl_2 als Säurekomponente fällt daher schwer. Es erscheint unwahrscheinlich, dass Wasser und Blausäure aufgrund zu langsamer Wanderung von der Säurekomponente nicht zum Elektrodenchip gelangten, da beim alleinigen Einsatz von wasserfreier Citronensäure zumindest Wassersignale beobachtet werden konnten.

Die Messungen mit Hexacyanidoferrat als Mediator (Abbildungen 3.88 und 3.89, Seite 152) verliefen unbefriedigend, da hier ebenfalls kein Unterschied zwischen cyanidfreien und cyanidhaltigen Zugaben erkannt werden konnte.

Dies gilt gleichermaßen für die Messung von NADH ohne Mediator, die analog dem Durchflusssensor mit zwei Enzymen (Kapitel 3.4) durchgeführt wurden (Abbildung 3.83 auf Seite 146). Möglicherweise wirken sich Flüssigkeitszugaben bei einem Potential von 0,8 V besonders stark aus, so dass die bereits beschriebenen Vorgänge das durch Cyanid hervorgerufene Signal bei weitem überdecken. Für diese These sprechen auch die sehr hohen Signalthöhen des Blindchips ohne Cyanidase von über 100 nA pro Stufe, die nur bei einer anderen Messung (Abbildung 3.89 auf Seite 152) beobachtet wurden.

Dagegen zeigte sich bei zwei von drei Messungen aus Kapitel 3.5.13, die MB als Mediator beinhalten, ein Unterschied der Sensorantwort bezüglich cyanidfreier und cyanidhaltiger Proben. Während beim in Abbildung 3.85 auf Seite 148 dargestellten Versuch sämtliche Zugaben, ob mit oder ohne Cyanid, etwa gleich hohe Stromstufen bewirkten, sind die Signalthöhen des Sensors auf cyanidhaltige Proben in den Abbildungen 3.84 (Seite 147) und 3.86 (Seite 149) deutlich höher als die der cyanidfreien Zugaben. Bei beiden Sensogrammen des Chips mit Cyanidase zeigt sich jedoch, dass der Aufbau in der untersuchten Form nicht für reale Proben geeignet ist, da das Signal nach Cyanidzugaben nicht stabil blieb, sondern rasch wieder abfiel. Damit zusammenhängend ist keine lineare Korrelation der Signalthöhe mit der Stoffmenge des zugegebenen Cyanids vorhanden. Zudem zeigt das Sensogramm des Chips mit cyanidhaltiger Mischung in Abbildung 3.86 starkes Rauschen.

Der Abfall des Signals auf Cyanid nach vorangegangenen Anstieg könnte einerseits mit dem aus Abbildung 3.54 auf Seite 122 bekannten Phänomen zusammenhängen, indem die Orientierung des Elektrodenchips Einfluss auf den Gesamtverlauf des Signals nimmt. Eine weitere Erklärung könnte der bereits beschriebene, vorübergehend auftretende kapazitive Strom sein. Zudem könnten Nebenreaktionen von Cyanid mit Bestandteilen der Mischung oder der Oberfläche der Elektrode eine Rolle spielen. Dies wird gesondert in den Kapiteln 4.4 und 4.5 betrachtet.

4.4 Nebenreaktionen

Cyanid kann als Base, Nukleophil und Komplexligand mit vielen verschiedenen Partnern reagieren, wodurch die Detektion gestört werden könnte. Die Wahrscheinlichkeit

von Reaktionen mit den in der Mischung bzw. im Durchflusssystem vorhandenen Bestandteilen muss daher betrachtet werden. Im Folgenden werden zunächst die für die Enzymkaskade notwendigen Komponenten diskutiert, wobei jedoch die Situation bezüglich Mediatoren gesondert in Kapitel 4.5 besprochen wird. Anschließend wird die Reaktivität von Cyanid bezüglich zusätzlich vorliegender Verbindungen beleuchtet.

Wie in Kapitel 1.3.1 dargelegt, reagiert Cyanid mit NAD^+ . Bedingt durch den langsamen Ablauf der Reaktion und die niedrigen Cyanidkonzentrationen wird jedoch keine Beeinflussung des Durchflusssensors erwartet. Zudem floss NAD^+ erst nach der Umsetzung von Cyanid durch Cyanidase zum Hauptstrom, wobei allerdings bedacht werden muss, dass Cyanid von in Kartuschen immobilisierter Cyanidase nicht vollständig umgesetzt werden konnte. Dadurch kam bei jeder Messung eine Restmenge an Cyanid mit der NAD^+ -Lösung in Kontakt. Jedoch ist selbst die höchste vermessene Cyanidkonzentration mit 1 mM um Faktor 100 niedriger als die von Colowick beschriebene Konzentration von 0,1 M, bei der sich mit einer NAD^+ -Konzentration von 0,2 mM und einem pH von 8,2 nach 50 Minuten ein Gleichgewicht einstellt, bei dem NAD^+ zur Hälfte umgesetzt wird. Die im Vergleich zu den von Colowick beschriebenen Bedingungen leicht erhöhte NAD^+ -Konzentration von durchschnittlich 0,4 mM nach Zusammenfluss der NAD^+ -Lösung mit dem Hauptstrom wird dadurch mehr als aufgewogen. Zudem war bei den vorliegenden Messungen der pH niedriger als bei Colowick, wodurch die Reaktion nochmals langsamer abläuft. Im Falle des Gassensors erscheint eine Störung durch diese Reaktion ebenfalls sehr unwahrscheinlich, da hier die durch Cyanidase vermittelte, irreversibel ablaufende Hydrolyse in Konkurrenz zur langsamen, reversiblen Reaktion von Cyanid mit NAD^+ steht.

Die durch das Fehlen eines zentralen Metallions bedingte theoretische Unempfindlichkeit der verwendeten FDH gegenüber Cyanid konnte durch die Versuche zum Durchflusssensor praktisch bestätigt werden. Die Signalhöhe von Cyanidstandard im Vergleich zu NADH-Standard (z. B. Abbildung 3.36, Seite 102) entsprach ungefähr der mit Formiat ermittelten und auf NADH-Standard bezogenen Umsatzrate der Kartusche (Kapitel 3.4.4).

Von den Bestandteilen des Biosensor-Fließmittels pH 7, Kaliumdihydrogenphosphat und Kaliumchlorid, wird keine Reaktion mit Cyanid erwartet. Für Aufbauten im Durchfluss verbleiben damit nur noch die Elektroden selbst, die mit Cyanid reagieren könnten. Die Interaktion von Cyanid mit Pt-WE wurde bereits ausführlich diskutiert (Kapitel 4.2). Elektrodenchips vom Typ W5 reagieren mit einer Verstärkung des Basislinienrauschens auf Cyanid (Abbildung 3.15). Die Ursache ist unklar, da die genaue Zusammensetzung des Elektrodenmaterials nicht bekannt ist. Eine Reaktion von Cyanid mit Graphit erscheint unwahrscheinlich. Der Einfluss von Cyanid auf Elektrodenchips vom Typ W4 wird in Kapitel 4.7.1 besprochen.

Die beim Gassensor verwendeten Mischungen enthielten etliche weitere Substanzen. Durch die Cyanidase-Lösung wurde Imidazol eingetragen. Die FDH war laut Angabe der liefernden Firma JFC in einem Phosphatpuffer mit Zusätzen von EDTA und Ammoniumsulfat gelagert, die dadurch auch in Gassensor-Mischungen vor-

handen waren. Weiterhin enthielten Mischungen auf Elektrodenchips für Messungen im Gasraum Glycerol. Keine dieser Verbindungen reagiert mit Cyanid, was im Falle von Imidazol durch eine Suche mittels SciFinder (Datenbank CASREACT, abgerufen am 03.03.2010) und CrossFire Beilstein Database (Datenbank Beilstein Abstracts 2010/01) überprüft wurde.

Problematisch im Bezug auf Nebenreaktionen sind somit lediglich manche Elektrodenmaterialien und Mediatoren (siehe folgendes Kapitel).

4.5 Mediatoren

Die Suche nach einem geeigneten Mediator für NADH erwies sich als schwierig. In der Literatur sind sehr viele Mediatoren beschrieben, von denen sich etliche auch für die Bestimmung von NADH eignen. Allerdings musste in Betracht gezogen werden, dass viele diese Mediatoren mit Cyanid reagieren. Nicht mit Cyanid abgesättigte Eisenionen in PB, das zunächst für die Erweiterung eines Formiatsensors nach Zhao et al. zum Einsatz kommen sollte, würden durch Cyanid komplexiert werden. Als Schlussfolgerung daraus könnte Hexacyanidoferrat verwendet werden, da in dieser Verbindung die Eisenionen bereits mit Cyanid gesättigt sind. Jedoch besitzt Hexacyanidoferrat an Graphit-WE eine hohe Überspannung, wie in Abbildung 3.87 auf Seite 151 zu sehen ist. Daraus folgt, dass ein relativ hohes Potential angelegt werden müsste. Bei diesem hohen Potential würden zum einen auch andere Substanzen detektiert werden, wodurch der Sinn eines Mediators verloren ginge. Zum anderen kann angenommen werden, dass ein hohes Potential auch die Signale auf Wasserzugaben erhöht. Zudem konnte, wie bereits beschrieben, bei Einsatz von Hexacyanidoferrat als Mediator kein Unterschied zwischen cyanidfreien und cyanidhaltigen Proben beobachtet werden.

Weit verbreitet ist der Einsatz von Phenoxazinderivaten als Mediatoren. MB, die für die meisten Versuche im Gasraum verwendete Substanz, zählt zu dieser Gruppe. Wie jedoch Huck darlegt [Huc82], reagiert MB mit Cyanid (Abbildung 4.1). Durch diese Reaktion wird MB deaktiviert und steht nicht mehr als Elektronenüberträger zur Verfügung. Die Desaktivierung könnte neben dem Einfluss der Orientierung des Elektrodenchips sowie dem Auftreten eines temporären kapazitiven Stroms eine weitere Erklärung für den Abfall der Signale bei fortschreitender Messdauer sein, der bei vielen Messungen (z. B. Abbildung 3.84, Seite 147) beobachtet wurde. Die Reaktion von Cyanid mit MB ist besonders problematisch, da MB zumindest teilweise an die Oberfläche der Elektrode adsorbiert vorliegt. Eine Desaktivierung von adsorbiertem MB vermindert somit die für die elektrochemische Umsetzung verfügbare Elektrodenoberfläche. Dies stellt ein weiteres Beispiel von *electrode fouling* dar.

Die Verwendung anderer Phenoxazinderivate ist keine Option, da diese in gleicher Weise mit Cyanid reagieren. Huck merkt in seiner Veröffentlichung an, dass sich Cyanid als „ausgesprochenes Katalysatorgift für alle Phenoxazinderivate“ erweist. Diese Tatsache war dem Autor zu Beginn der Arbeiten am Gassensor unbekannt und wurde erst in einer ausführlichen und gezielt auf die Empfindlichkeit von MB bezüglich Cy-

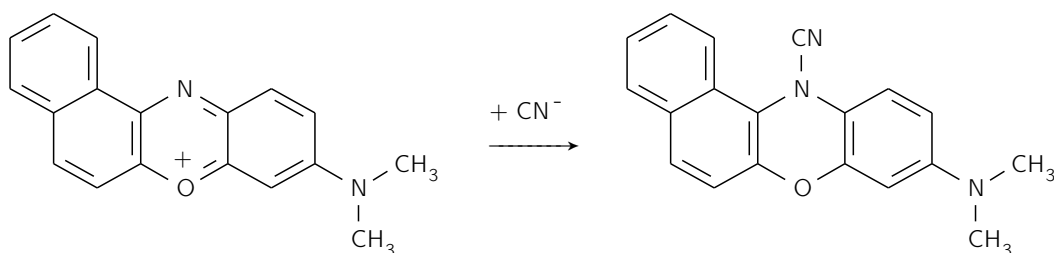


Abbildung 4.1: Desaktivierung von MB durch Reaktion mit Cyanid nach [Huc82].

nid gerichteten Literaturrecherche gefunden, da Huck in einer kleineren und nicht auf PubMed gelisteten Zeitschrift in deutscher Sprache veröffentlichte.

Weitere getestete Mediatoren aus der Gruppe der vollständig substituierten Benzochinone erwiesen sich als ungeeignet zum Einsatz beim vorliegenden Sensoraufbau (Kapitel 3.5.9). Aufgrund dieser Betrachtungen kann konstatiert werden, dass in der vorliegenden Arbeit kein optimaler Mediator für einen Cyanid-Biosensor gefunden wurde.

4.6 Abschließende Bewertung der Versuche zum Gassensor

Obwohl das gewählte Messprinzip der Abtrennung von Blausäure aus Proben mit anschließender Reaktionskaskade unter Beteiligung von Cyanidase, FDH und MB höchstwahrscheinlich in der Lage ist, bei einem Potential von 0,1 V Cyanid zu detektieren, überwiegen die Probleme des vorliegenden Aufbaus. Diese Probleme bestehen im Einzelnen vor allem aus Reaktionen des Sensors auf Wasserzugaben, instabilen Basislinien, um Größenordnungen schwankenden Signalhöhen, nichtlinearem Ansprechen auf Cyanid mit Abfall des Signals bei fortschreitender Messdauer, Reaktion des Mediators MB mit Cyanid und Einfluss der Stellung des Elektrodenchips auf das Signal. Somit ist der Gassensor im momentanen Entwicklungszustand weit davon entfernt, praxistauglich zu sein.

4.7 Durchflusssensor mit Detektion von NADH

4.7.1 Besonderheiten und Probleme

Im Gegensatz zum Gassensor traten mit dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Durchflusssensor nur wenige Probleme auf. Der größte Nachteil des Aufbaus ist die teilweise unzureichende Stabilität des Signals im Verlauf von Messungen. Dies kann anhand eines Vergleichs der Peakhöhen von Cyanidstandards, die zu Beginn sowie am Ende von Messungen injiziert wurden, beobachtet werden. Bei manchen Messungen be-

saß der Peak des abschließend vermessenen Cyanidstandards bezogen auf die Höhe des zu Beginn der Messung injizierten Cyanidstandards noch ausreichende 78 % (Abbildung 3.36, Seite 102) oder sogar gute 91 % (Abbildung 3.40, Seite 108), 90 % (Abbildung 3.41, Seite 108) und 89 % (Abbildung 3.42 auf Seite 109). Nicht zufriedenstellende Werte von 56 % (Abbildung 3.39, Seite 106) und 37 % (Abbildung 3.37, Seite 102) wurden jedoch auch beobachtet. Dies ist höchstwahrscheinlich auf das in Kapitel 1.2.4 beschriebene *electrode fouling* durch die direkte Oxidation von NADH zurückzuführen. Dabei ist eine Korrelation des Abfalls der Sensitivität mit der Dauer der Messung zu beobachten. Ebenso bewirkte eine höhere NADH-Konzentration der Probe einen stärkeren Signalabfall. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wang, Angnes und Martinez [WAM92] und ist besonders deutlich in Kapitel 3.4.6 (Signalstabilität) zu erkennen. Bei einer NADH-Konzentration von 100 μM besaß der Peak der zwölften Injektion von NADH-Standard nach fast 5000 s Messzeit noch 80 % der Höhe des Peaks der ersten Injektion (Abbildung 3.28 auf Seite 96). Dagegen trat bei einer NADH-Konzentration von 4 mM ein wesentlich schnellerer Abfall des Signals auf. Wie aus Abbildung 3.29 auf Seite 97 ersichtlich, besaß bereits der Peak der dritten Injektion von NADH-Standard 4 mM nur noch ca. ein Drittel der Höhe des ersten Peaks.

Die in diesem Kapitel ebenfalls untersuchte Behandlung der WE mit einer elektrochemischen Reinigungsprozedur konnte zwar eine vorübergehende Erhöhung des Signals bewirken, eine Stabilisierung der Peakhöhen wurde aber erst nach einigen Injektionen erreicht. Diese Stabilisierung hielt auch ohne elektrochemische Prozedur an. Fraglich ist daher, ob der Effekt durch die Reinigungsprozedur verursacht war. Eventuell stabilisiert sich das Signal auch ohne elektrochemische Behandlung. Auch manche in der Literatur vorgeschlagene Lösungsansätze für die bei direkter Bestimmung von NADH auftretenden Probleme zeigen, dass anfänglich ein Abfall der Sensitivität gefolgt von einer Stabilisierung der Signale stattfindet, so z. B. bei Modifikation der Elektrodenoberfläche mit Polythionin durch Gao et al. [GCY⁺03]. Eine Weiterentwicklung des enzymatischen Durchflusssensors muss vor allem an dieser Stelle ansetzen.

Zu diesem Zweck könnte die Aufklärung eines weiteren Phänomens hilfreich sein. In Kapitel 3.4.11 (Lagerstabilität) wurden bei Wiederverwendung von Elektrodenchips unter bestimmten Umständen höhere Ansprechraten im Vergleich zum erstmaligen Einsatz des Chips beobachtet. Elektrodenchips, die während der Reinigung der Durchflussanlage mit Wasser bei angelegtem Potential im Aufbau verblieben, zeigten in nachfolgenden Messungen wesentlich geringere Ansprechraten. Die Ursache für dieses Verhalten ist unklar. Möglicherweise steht es in Zusammenhang mit einer Erhöhung des Potentials der RE aufgrund der Erniedrigung der Chloridkonzentration. Wie in Gleichung 4.4 (Seite 161) gezeigt, hängt das Potential der RE von der Konzentration der Chloridionen ab. Wird Biosensor-Fließmittel pH 7 durch reines Wasser ersetzt, gehen Silber- und Chloridionen entsprechend dem Löslichkeitsprodukt ($1,8 \times 10^{-10} \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^{-2}$) aus festem AgCl, das Bestandteil der RE ist, in Lösung. Unter der Annahme, dass unmittelbar an der Oberfläche der RE Sättigung vorliegt, kann

die Potentialverschiebung durch die Änderung der Chloridkonzentration von 0,1 M (Biosensor-Fließmittel pH 7) auf 13 μM (Wurzel des Löslichkeitsprodukts von AgCl) mittels des Verdünnungsfaktors (Gleichung 4.5) berechnet werden. Sie beträgt ungefähr +0,23 V. Da das Potential der WE relativ zur RE eingestellt wird, ändert sich dieses um den gleichen Betrag. Hierbei könnten nicht näher spezifizierte, elektrochemische Reaktionen stattfinden, welche die Oberfläche der WE blockieren.

Der Effekt war jedoch reversibel. Wurden Chips, die zuvor eine deutlich erniedrigte Sensitivität besaßen, direkt nach der Messung aus der Durchflussszelle entfernt und nur kurz mit Wasser gespült, war die Ansprechrate gegenüber der ersten Messung mit dem jeweiligen Chip deutlich erhöht. Unter diesen Umständen kann davon ausgegangen werden, dass eine Beseitigung dieser Blockade mit einfachen Mitteln möglich sein sollte. Der Mechanismus, der dieser Regeneration zugrunde liegt, bleibt jedoch unbekannt.

Unklar bleibt auch, weshalb bei den Versuchen zum Beweis des postulierten Sensorprinzips (Kapitel 3.4.5) bei Cyanidinjektionen in ein System ohne Cyanidase-Kartusche ein Peak auftritt, dessen Höhe bei wiederholter Injektion ansteigt. Während die Erklärung dieses Phänomens beim Einsatz einer Pt-WE noch leicht fiel, ist es im Falle einer Graphit-WE nicht so einfach zu beantworten. Denkbar wäre eine Einflussnahme des Cyanids auf die Silber-Silberchlorid-RE. Durch das niedrigere Löslichkeitsprodukt von AgCN ($1,2 \times 10^{-16} \text{ mol}^2 \cdot \text{L}^{-2}$) im Vergleich zu AgCl könnte sich deren Potential und somit auch das Potential der WE absenken. Analog zu den in Kapitel 4.3 beschriebenen Vorgängen sollte dadurch der Stromfluss aber sinken und nicht ansteigen. Zudem wäre eine immer gleiche Höhe der Peaks zu erwarten. Die AE hingegen bestand zwar aus Pt, aber Vorgänge an der AE sollten sich bei korrekter Funktionsweise des Potentiostaten nicht im Sensogramm niederschlagen. Somit bleiben als Ursache ungeklärte Vorgänge an der WE. Die Bedeutung dieses Phänomens für den Durchflusssensor wird jedoch als niedrig eingeschätzt, da die Peaks wesentlich kleiner als die mit regulärem Aufbau erhaltenen Peaks waren. Zudem wird ein Großteil des Cyanids durch den Einsatz der Cyanidase-Kartusche hydrolysiert, so dass der Anteil von Cyanid im NADH-Peak nochmals verringert wäre.

Die Bestimmung der Cyanidkonzentration in Realproben zeigte in den drei Fällen, die einen Vergleich mit der Methode nach DIN beinhalteten, eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Durchflusssensor und Referenzmethode (Tabelle 3.10 auf Seite 107). Experimente, bei denen lediglich die König-Reaktion ohne vorherige Abtrennung des Cyanids nach DIN zur Überprüfung der Ergebnisse herangezogen wurde, ergaben bei Kirschlorbeerproben zum Teil Abweichungen von 100 % (Abbildung 3.38 sowie Tabelle 3.9 ab Seite 104). Die Werte des enzymatischen Durchflusssensors lagen hier ohne Ausnahme über denen des Farbassays. Bei Bittermandelproben dagegen korrelierten die Werte von Durchflusssensor und Farbassay gut, obwohl sie in der gleichen Messung wie stark abweichende Kirschlorbeerproben bestimmt wurden. Die Abweichungen bei Kirschlorbeerproben können zum Teil damit erklärt werden, dass der Farbassay durch Bestandteile der Extrakte von Kirschlorbeerblättern, aber

nicht durch Extrakte von Bittermandeln gestört wurde. Der in Tabelle 3.11 auf Seite 107 gezeigte Vergleich, bei dem mit dem Farbbassay im Mittel um 9 % zu niedrige Cyanidkonzentrationen in Extrakten im Vergleich zu Absorptionslösungen gemessen wurden, bestätigt dies. Allerdings können Abweichungen von 100 % nicht allein von dieser Störung verursacht sein. Der Hauptgrund für die zu hohen Werte des Durchflusssensors liegt daher vermutlich im Abfall der Sensitivität. Wie in Abbildung 3.39 (Seite 106) zu erkennen, besaß der Peak des am Ende der Messung injizierten Cyanidstandards lediglich 56 % der Höhe des Cyanidstandards, der zu Beginn vermessen wurde. Von diesem Abfall waren möglicherweise hauptsächlich Proben betroffen, die am Ende vermessen wurden. Dabei handelte es sich um die zweiten Injektionen aller Proben, wobei die NAD^+ -Zufuhr durch Puffer ersetzt war. Da Bittermandelproben kaum Substanzen enthielten, die bei 0,8 V ein Signal hervorrufen, wurden die Ergebnisse der Bittermandelproben nicht verfälscht. Bei Kirschchlorbeerproben war dagegen eine Korrektur der unter NAD^+ -Zufluss erhaltenen Peaks erforderlich. Aufgrund des Verlusts der Sensitivität war die Höhe dieser Korrektur zu niedrig und der errechnete Wert dadurch zu hoch. Mit den drei Messungen, die mit der DIN-Methode überprüft wurden, waren jeweils nur geringe Sensitivitätsverluste im Laufe der Messungen verbunden (Abbildungen 3.40 bis 3.42). Somit besaß in diesen Fällen die Korrektur die richtige Höhe.

4.7.2 Vergleich mit anderen Cyanidsensoren

Die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze lagen mit 0,7 und 2,4 μM im Bereich vieler bereits beschriebener enzymatischen bzw. Biosensoren für Cyanid. Allerdings ist zu beachten, dass die Proben in Puffer zwanzigfach verdünnt wurden. Die real bestimmbaren Konzentrationen lägen somit bei mindestens 48 μM . Die Verdünnung könnte aber angepasst werden. Des Weiteren ist die gewählte Formel zur Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze ($\text{Blindwert} + 3 \times \text{Höhe des Basislinienrauschens}$) sehr konservativ gewählt. Andere Autoren verwenden z. B. das zwei- [PIS97] oder dreifache Basislinienrauschen [SMC04, WTL⁺98], wobei der Blindwert nicht einbezogen wird. Manche geben die Methode zur Berechnung der Nachweisgrenze auch einfach nicht an [Fon87]. Die unterschiedliche Behandlung dieses Themas wurde bereits in Kapitel 3.4.8 mit Verweis auf die Veröffentlichung von Neitzel [Nei03] angesprochen. Bei Berechnung mittels des drei- bzw. zehnfachen Basislinienrauschens ohne Berücksichtigung des Blindwerts würden niedrigere Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von 0,1 μM und 1,8 μM erhalten werden. Eine Detektion von Cyanid in Trinkwasser in der von der WHO als Grenzwert empfohlenen Konzentration von 2,7 μM wäre somit problemlos möglich. Darüber hinaus sind Grenzwerte anderer Organisationen höher. Die US-amerikanische Environmental Protection Agency beispielsweise setzt die Grenzkonzentration (*Maximum Contaminant Level*) in Trinkwasser bei 7,7 μM an. Es wäre auch denkbar, die für diese Arbeit benutzten peristaltischen Pumpen durch Kolbenpumpen zu ersetzen, wodurch möglicherweise das

Basislinienrauschen erheblich reduziert werden könnte. Das Rauschen könnte auch durch den Einsatz eines Faradayschen Käfigs zur Abschirmung von elektromagnetischer Strahlung verringert werden. Zuletzt könnten das Volumen der Probenschleife und die NAD^+ -Konzentration erhöht werden, um ein besseres Verhältnis von Peakhöhe und Basislinienrauschen zu erreichen.

Wesentlich empfindlichere Sensoren wurden beschrieben. An erster Stelle ist hier der Sensor von Shan, Mousty und Cosnier zu nennen, der eine Nachweisgrenze von 0,1 nM besitzt [SMC04]. Dieser Sensor, basierend auf der Hemmung einer Polyphenoloxidase, hat allerdings den Nachteil, dass er nach einer Messung nur bedingt wiederverwendbar ist. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Durchflusssensor können dagegen wiederholte Messungen durchgeführt werden. Zudem ist der Einsatz in automatisierten Systemen möglich. Dafür spricht auch der weite lineare Bereich von der Nachweisgrenze bis zu mindestens 1000 μM .

Die Lagerstabilität, bei der nach über drei Monaten noch keine Verringerung der Empfindlichkeit festgestellt werden konnte, übertrifft die meisten in der Literatur beschriebenen Sensoren bei weitem. Des Weiteren konnten keine Störungen durch Nitrile und Sulfid sowie nur eine leichte Störung durch Thiocyanat beobachtet werden. Prinzipbedingt ist allerdings eine Störung durch Formiat zu erwarten, die bei gleicher Konzentration höhere Signale als Cyanid hervorrufen sollte, da Cyanid durch die Cyanidase-Kartusche nicht vollständig zu Formiat umgesetzt wird. Dennoch ist der vorliegende Sensor als sehr unempfindlich gegenüber Störungen anzusehen. Sensoren, die auf der Hemmung von Enzymen oder dem Stoffwechsel ganzer Zellen basieren, werden vermutlich durch wesentlich mehr Stoffe beeinflusst und sind teilweise nicht wiederverwendbar. Auf der Messung des pH-Werts aufbauende Prinzipien sind im Gegensatz zum hier vorgestellten Sensor abhängig von der Pufferkapazität der Probe.

Die Robustheit des Sensors zeigt sich in der Analyse von Realproben. Kein bislang beschriebener, auf biologischen Erkennungsprinzipien basierender Sensor für Cyanid wurde mit Realproben in der Komplexität von Pflanzenextrakten konfrontiert. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des vorliegenden Sensors mit denen der Standardmethode nach DIN ist ausgezeichnet, sofern kein nennenswerter Abfall der Sensitivität auftrat (siehe voriges Kapitel). Gleichzeitig ist der Aufwand im Vergleich zur DIN-Methode sowohl bezogen auf die benötigte Zeit als auch auf die Anzahl der Arbeitsschritte wesentlich geringer.

4.7.3 Abschließende Bewertung des Durchflusssensors

Obwohl der auf den Enzymen Cyanidase und FDH sowie dem Elektrodentyp W4 beruhende Durchflusssensor besonders bezüglich der Stabilität des Signals noch weiterentwickelt werden sollte, könnte er bereits für Routinemessungen im Labor eingesetzt werden. Die Erwartungen, die an ein auf direkter Detektion von NADH aufgebautes System gestellt wurden, wurden deutlich übertroffen. Verglichen mit in der Literatur beschriebenen Sensoren mit biologischen Komponenten zeigen sich teilweise überlege-

ne Eigenschaften vor allem im Hinblick auf Robustheit und Lagerstabilität. Nachweis- und Bestimmungsgrenze bewegen sich in einem für die Messung toxischer Cyanidkonzentrationen geeigneten Bereich. Die Möglichkeit, Proben automatisiert ohne aufwändige Vorbereitungsschritte zu analysieren, empfehlen den gewählten Messaufbau als vielversprechende Alternative zur DIN-Methode 38405-13. Das Ziel, den Cyanidgehalt in cyanogenen Pflanzen bestimmen zu können, wurde mit diesem Sensor erreicht.

4.8 Ausblick

Wie bereits erwähnt, sollte der Durchflusssensor mit Detektion von NADH vorrangig im Bezug auf die Stabilität des Signals während der Messung verbessert werden. Von den zahlreichen, in Kapitel 1.2.4 aufgeführten Möglichkeiten bietet sich vor allem die Suche nach geeigneten Mediatoren an, die eine sichere Reaktivierung von NAD^+ bei gleichzeitiger Stabilität gegenüber Cyanid gewährleisten. Die Reaktivierung von NAD^+ ist für Messungen im Durchfluss eigentlich nicht notwendig, da kontinuierlich frisches NAD^+ zugeführt wird. Das Messprinzip wäre dann aber leicht auf andere Aufbauten übertragbar, die nicht auf einem Durchflussprinzip basieren. Um lediglich Messungen im Durchfluss zu stabilisieren, könnten auch Lösungsansätze wie andere Elektrodenmaterialien oder Oberflächenmodifikationen zum Einsatz kommen. Unter Beibehalt der verwendeten Elektrodenchips wäre zudem denkbar, weitere elektrochemische Regenerationsprozeduren zu untersuchen.

Eher zweitrangig sind Maßnahmen, um das Basislinienrauschen zu unterdrücken. Dazu könnte die Verwendung von Kolbenpumpen zur Verringerung von Druckschwankungen und eventuell der Einsatz eines Faradayschen Käfigs zur Abschirmung von elektromagnetischer Strahlung erwogen werden. Allerdings bleibt fraglich, inwiefern die damit erreichte, rechnerische Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze auch praktisch eine Verbesserung der Sensitivität bezüglich Messungen von Realproben bewirkt, wenn die Differenz zweier Messungen wie bei der beschriebenen Analyse von Kirschlorbeerblättern herangezogen wird.

Der Ansatz zur Messung von Blausäure im Gasraum erfordert dagegen eine grundsätzliche Untersuchung der Vorgänge im Messaufbau. Hier könnte ein kommerzieller Gassensor für Blausäure zusammen mit einem Temperatur-Feuchte-Logger Klarheit über die Zusammensetzung und Charakteristika der Gasphase schaffen. Auf dieser Grundlage sollte dann die Klärung der beobachteten Phänomene wie die Reaktion des Sensors auf Wasserzugaben erfolgen. Über die genaue Ausgestaltung weiterer Maßnahmen, die beispielsweise eine bessere Reproduzierbarkeit der Verteilung der Mischung auf den Chips zum Ziel haben, kann hier nur spekuliert werden. Dies soll daher einem Zeitpunkt vorbehalten bleiben, an dem die Vorgänge besser verstanden werden.

Für alle Sensoraufbauten kann zuletzt in Betracht gezogen werden, die verwendete Cyanidase gegen eine Cyanidase mit höherer Aktivität auszutauschen. Auf diese Weise könnten Störungen durch Nebenreaktionen von Cyanid mit Komponenten wie beispielsweise Mediatoren verringert werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines amperometrischen Biosensors für Cyanid unter Ausnutzung einer dreistufigen Reaktionskaskade mit Beteiligung von zwei Enzymen. In der ersten Stufe dieser Kaskade wird Cyanid bzw. dessen korrespondierende Säure Blausäure von Cyanidase (EC 3.5.5.1) zu Ammoniak und Ameisensäure umgesetzt. Formiat als korrespondierende Base der Ameisensäure wird in der Folge von Formiatdehydrogenase (EC 1.2.1.2) zu Kohlendioxid oxidiert, wobei NAD^+ als Cosubstrat zu NADH reduziert wird. Auf der dritten Stufe reagiert die oxidierte Form eines Redoxmediators mit NADH und wird unter Regeneration von NAD^+ in die reduzierte Form überführt. Amperometrisch quantifizierbar sind Formiat auf der ersten, NADH auf der zweiten sowie die reduzierte Form des Mediators auf der dritten Stufe.

Die verwendete Cyanidase konnte mit guten Ausbeuten rekombinant in *E. coli* hergestellt, aufgereinigt und charakterisiert werden. Enzymkinetische Parameter betrugen für K_M ungefähr 1 mM und für v_{\max} 200 nkat·mg⁻¹. Bei Lagerung im Kühlschrank wurde eine Halbwertszeit der Aktivität von 35 Tagen ermittelt, die durch Zusätze von kompatiblen Soluten nicht erhöht werden konnte. Eine Erhöhung der Halbwertszeit wurde dagegen durch Lagerung im Gefrierschrank oder durch kovalente Immobilisierung an NHS-aktivierte Sepharose-Kartuschen erreicht.

Technisch kamen zwei verschiedene Sensoraufbauten zum Einsatz. Zum einen wurde ein Durchflusssystem benutzt, das aus einem Injektionsventil, Enzymkartuschen und einer Durchflussszelle für amperometrische Elektrodenchips bestand. Zum anderen wurden Messungen in der Gasphase durchgeführt, wobei ein Elektrodenchip mit einer Mischung aus den für die Kaskade benötigten Enzymen und Reagenzien bedeckt und im Gasraum eines abgeschlossenen Gefäßes platziert wurde. Am Boden des Gefäßes befand sich eine Säurekomponente, die nach Zugabe von Proben darin enthaltenes Cyanid protonierte. In der Folge trat Blausäure in den Gasraum über und gelangte zur Mischung auf dem Elektrodenchip.

Formiat aus der ersten Stufe der Kaskade konnte durch Platin-Arbeits Elektroden detektiert werden. Im Durchflusssystem war eine Kartusche mit immobilisierter Cyanidase jedoch nicht in der Lage, das gesamte Cyanid umzusetzen. Das restliche Cyanid interferierte mit der Platin-Elektrode, was sich beim ersten Kontakt in einem sehr hohen, bei nachfolgenden Kontakten in schwächeren Signalen äußerte. Ein Abfangen des nicht hydrolysierten Cyanids durch Bildung von Metallkomplexen war nicht erfolgreich. Die Bestimmung von Cyanid durch amperometrische Detektion eines Produkts der ersten Stufe der Reaktionskaskade gelang somit nicht störungsfrei.

Die direkte Bestimmung von NADH mittels Amperometrie wird in der Literatur als problematisch beschrieben, da eine hohe Überspannung notwendig ist und eine

Passivierung der Elektrodenoberfläche auftritt. Diese Probleme wurden zwar auch in dieser Arbeit beobachtet, behinderten aber die Messung nicht in größerem Umfang. Vielmehr konnte ein Durchflusssensor konstruiert werden, bei dem Proben zunächst eine Kartusche mit immobilisierter Cyanidase durchflossen. Nach Zufluss von NAD^+ -Lösung zum Hauptstrom passierten die Proben eine Kartusche mit immobilisierter Formiatdehydrogenase. Die Bestimmung von entstandenem NADH wurde in einer Flusszelle mit einer Graphit-Arbeits Elektrode bei einem Arbeitspotential von 0,8 V vorgenommen. Für diesen Aufbau wurde eine Nachweisgrenze von 0,7 μM und eine Bestimmungsgrenze von 2,4 μM ermittelt. Der lineare Bereich erstreckte sich von der Bestimmungsgrenze bis zu 1 mM. Nitrile als Cyanidanaloga sowie Sulfid störten die Messung nicht, Thiocyanat interferierte leicht. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass Formiat im Vergleich zu Cyanid überproportional hohe Signale hervorruft.

Messungen von Realproben mit komplexen Matrices wie Pflanzenextrakten waren möglich, indem Proben zweifach vermessen wurden. Bei einer der beiden Messungen wurde die NAD^+ -Zufuhr durch reinen Puffer ersetzt, so dass die Reaktionskaskade unterbrochen war und lediglich der nicht durch Cyanid verursachte Anteil des Signals erhalten wurde. Durch Differenzbildung mit dem Signal bei vorhandener NAD^+ -Zufuhr konnte der durch Cyanid hervorgerufene Anteil des Signals berechnet werden. Die Richtigkeit der ermittelten Cyanidkonzentrationen in Extrakten von Kirschchlorbeerblättern wurde mit der DIN-Methode 38405-13 überprüft, wobei mit einer mittleren Abweichung von -4,8 % eine gute Übereinstimmung gefunden wurde. Weiterhin wurde eine sehr gute Langzeitstabilität des Aufbaus festgestellt. Nach mehr als drei Monaten konnte noch kein Abfall der Sensitivität beobachtet werden.

Messungen im Gasraum erwiesen sich dagegen als problembehaftet. Cyanidfreie Zugaben von Wasser oder verdünnter Natronlauge in die Säurekomponente verursachten Signale, die in vielen Fällen die gleiche Höhe wie Signale cyanidhaltiger Proben erreichten. Ein starker Einfluss des Wasserdampfdrucks auf das Signal wird vermutet. Lediglich bei Einsatz des Mediators Meldolablauf zusammen mit Graphit-Arbeits Elektroden, also unter Ausnutzung der vollständigen, dreistufigen Kaskade, konnten cyanidfreie von cyanidhaltigen Proben im millimolaren Konzentrationsbereich unterschieden werden. Die dabei im Gasraum vorhandenen Blausäuremengen bewegten sich zwischen 2–800 ppm. Weitere untersuchte Mediatoren wie Kaliumhexacyanidoferrat und Benzochinonderivate erwiesen sich als weitgehend ungeeignet. Die Signalhöhen waren jedoch auch mit Meldolablauf als Mediator nur schwer reproduzierbar. Zudem verschlechterte sich das Ansprechverhalten des Sensors mit fortschreitender Messdauer. Die Orientierung des Elektrodenchips im Gasraum nahm ebenfalls Einfluss auf den Signalverlauf. Versuche, die Mischung auf dem Elektrodenchip zu fixieren, verliefen unbefriedigend. Ebenso zeigten chemische und elektrochemische Modifikationen der Arbeitselektrode wenig Erfolg. Hier bedarf es weiterer Entwicklungsarbeit, um einen praktikablen amperometrischen Gassensor nach dem vorgestellten Messprinzip zu erhalten. Die dreistufige Reaktionskaskade scheint jedoch grundsätzlich geeignet für Messungen im Gasraum.

Eigene Veröffentlichungen

Artikel

Turek, M., L. Ketterer, M. Claßen, H. K. Berndt, G. Elbers, P. Krüger, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Development and Electrochemical Investigations on an EIS- (electrolyte-insulator-semiconductor) based Biosensor for Cyanide Detection*. Sensors, 7:1415–1426, 2007.

Ketterer, L. und M. Keusgen: *Amperometric Sensor for Cyanide Utilizing Cyanidase and Formate Dehydrogenase*. Eingereicht bei Analytica Chimica Acta, 2010.

Ketterer, L. und M. Keusgen: *Biosensor Approaches to Cyanide Detection in Gaseous Phase*. In Vorbereitung.

Tagungsbeiträge

Ketterer, L. und M. Keusgen: *Amperometric Biosensor for Detection of Hydrocyanic Acid in Air*. DPhG Joint Meeting, Marburg, 04.10.–07.10.2006.

Turek, M., L. Ketterer, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Elektrochemische Untersuchungen von EIS-Strukturen für die Entwicklung eines Biosensors zur Cyanid-Erfassung*. 5. Deutsches BioSensor Symposium, Bochum, 18.03.–21.03.2007.

Turek, M., L. Ketterer, J. Schubert, P. Krüger, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Detection of cyanide by means of silicon-based semiconductor sensors*. 1. Graduierten-Tagung der FH Aachen, Jülich, 09.09.2008.

Turek, M., L. Ketterer, J. Schubert, P. Krüger, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Cyaniderfassung mittels Silizium-basierten Bio- und Chemosensoren*. 6. Deutsches BioSensor Symposium, Freiburg, 29.03.–01.04.2009.

Turek, M., L. Ketterer, S. Guo, J. Schubert, P. Krüger, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Detection of cyanide by means of silicon-based semiconductor sensors*. 2. Graduierten-Tagung der FH Aachen, Aachen, 05.11.2009.

Literaturverzeichnis

- [AAKP95] Amine, A., M. Alafandy, J. M. Kauffmann und M. N. Pekli: *Cyanide Determination Using an Amperometric Biosensor Based on Cytochrome Oxidase Inhibition*. Analytical Chemistry, 67:2822–2827, 1995.
- [ACMS90] Albery, J. A., A. E. G. Cass, B. P. Mangold und Z. X. Shu: *Inhibited enzyme electrodes. Part 3: A sensor for low levels of H₂S and HCN*. Biosensors and Bioelectronics, 5:397–413, 1990.
- [AFHS05] Aktories, Förstermann, Hofmann und Starke: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer, 9. Auflage, 2005.
- [AM03] Akcil, A. und T. Mudder: *Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review*. Biotechnology Letters, 25:445–450, 2003.
- [AT85] Arakawa, T. und S. N. Timasheff: *The stabilization of proteins by osmolytes*. Biophysical Journal, 47:411–414, 1985.
- [BB01] Bolen, D. W. und I. V. Baskakov: *The Osmophobic Effect: Natural Selection of a Thermodynamic Force in Protein Folding*. Journal of Molecular Biology, 310:955–963, 2001.
- [BC06] Baxter, J. und S. P. Cummings: *The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination*. Antonie van Leeuwenhoek, 90:1–17, 2006.
- [BCLR95] Besombes, J. L., S. Cosnier, P. Labbé und G. Reverdy: *A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides*. Analytica Chimica Acta, 311:255–263, 1995.
- [BDT⁺02] Barclay, M., J. C. Day, I. P. Thompson, C. J. Knowles und M. J. Bailey: *Substrate-regulated cyanide hydratase (chy) gene expression in Fusarium solani: the potential of a transcription-based assay for monitoring the biotransformation of cyanide complexes*. Environmental Microbiology, 4:183–189, 2002.
- [BG98] Beasley, D. M. G. und W. I. Glass: *Cyanide poisoning: pathophysiology and treatment recommendations*. Occupational Medicine, 48:427–431, 1998.

- [BH63] Bark, L. S. und H. G. Higson: *A Review of the Methods Available for the Detection and Determination of Small Amounts Of Cyanide*. The Analyst, 88:751 – 760, 1963.
- [BHDW91] Bowers, M. L., J. Heftner, D. L. Dugger und R. Wilson: *Solid-state analytical characterization of electrochemically modified glassy carbon electrodes*. Analytica Chimica Acta, 248:127–142, 1991.
- [BKPB92] Basheer, S., Ö. M. Kut, J. E. Prenosil und J. R. Bourne: *Kinetics of Enzymatic Degradation of Cyanide*. Biotechnology and Bioengineering, 39:629–634, 1992.
- [BKPB93] Basheer, S., Ö. M. Kut, J. E. Prenosil und J. R. Bourne: *Development of an Enzyme Membrane Reactor for Treatment of Cyanide-Containing Wastewaters from the Food Industry*. Biotechnology and Bioengineering, 41:465–473, 1993.
- [Bro76] Brown, A. D.: *Microbial Water Stress*. Bacteriological Reviews, 40:803–846, 1976.
- [BRR⁺02] Borges, N., A. Ramos, N. D. H. Raven, R. J. Sharp und H. Santos: *Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosyl-glycerate and other compatible solutes on model enzymes*. Extremophiles, 6:209–216, 2002.
- [BS72] Brown, A. D. und J. R. Simpson: *Water Relations of Sugar-tolerant Yeasts : the Role of Intracellular Polyols*. Journal of General Microbiology, 72:589–591, 1972.
- [BTS07] Berg, J. M., J. L. Tymoczko und L. Stryer: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage, 2007.
- [Buc98] Buchberger, W.: *Elektrochemische Analyseverfahren*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- [BWF⁺00] Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne: *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 28:235–242, 2000. <http://www.pdb.org>.
- [CAT⁺08] Cipollone, R., P. Ascenzi, P. Tomao, F. Imperi und P. Visca: *Enzymatic Detoxification of Cyanide: Clues from Pseudomonas aeruginosa Rhodanese*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 15:199–211, 2008.
- [CJA05] Cheng, J., P. Jandik und N. Avdalovic: *Pulsed amperometric detection of sulfide, cyanide, iodide, thiosulfate, bromide and thiocyanate*

- with microfabricated disposable silver working electrodes in ion chromatography.* Analytica Chimica Acta, 536:267–274, 2005.
- [CKC51] Colowick, S. P., N. O. Kaplan und M. M. Ciotti: *The Reaction of Pyridine Nucleotide with Cyanide and its Analytical Use.* Journal of Biological Chemistry, 191:447–459, 1951.
- [CL62] Clark, L. C. Jr. und C. Lyons: *Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery.* Annals of the New York Academy of Sciences, 102:29–45, 1962.
- [Cla56] Clark, L. C. Jr.: *Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions.* Transactions - American Society for Artificial Internal Organs, 2:41–48, 1956.
- [CR86] Christian, G. D. und J. Ruzicka: *Determination of Cyanide by Atomic Absorption Using a Flow Injection Conversion Method.* Analytical Chemistry, 58:38–42, 1986.
- [CR07] Christison, T. T. und J. S. Rohrer: *Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection.* Journal of Chromatography A, 1155:31–39, 2007.
- [CSG⁺09] Chang, A., M. Scheer, A. Grote, I. Schomburg und D. Schomburg: *BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009.* Nucleic Acids Research, Database issue, 37:D588–D592, 2009. <http://www.brenda-enzymes.org>.
- [Cum04] Cummings, T. F.: *The treatment of cyanide poisoning.* Occupational Medicine, 54:82–85, 2004.
- [DH95] Dubey, S. K. und D. S. Holmes: *Biological cyanide destruction mediated by microorganisms.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 11:257–265, 1995.
- [din81] *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Anionen (Gruppe D), Bestimmung von Cyaniden (D13), DIN 38405 Teil 13, Februar 1981.*
- [din06] *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Gehalts an gesamtem Cyanid und leicht freisetzbarem Cyanid - Verfahren mit kontinuierlicher Fließanalyse (ISO 17380:2004), DIN ISO 17380, Mai 2006.*
- [DM85] Dodds, C. und C. McKnight: *Cyanide toxicity after immersion and the hazards of dicobalt edetate.* British Medical Journal, 291:785–786, 1985.

- [dNBdC98] Nascimento, P. C. do, D. Bohrer und L. M. de Carvalho: *Cyanide determination in biological fluids using a microdiffusion method with a flow system and polarographic detection*. The Analyst, 123:1151–1154, 1998.
- [DSRW83] D'Amico, J. J., B. R. Stults, P. G. Ruminski und K. V. Wood: *Synthesis of 1-cyano-2-methylisoindole. A new route to isoindoles*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 20:1283–1286, 1983.
- [Ebb04] Ebbs, S.: *Biological degradation of cyanide compounds*. Current Opinion in Biotechnology, 15:231–236, 2004.
- [eni02] *Bestimmung von Gesamtcyanid und freiem Cyanid mit der kontinuierlichen Fließanalytik, EN ISO 14403*, Juli 2002.
- [Eps47] Epstein, J.: *Estimation of Microquantities of Cyanide*. Analytical Chemistry, 19:272–274, 1947.
- [Erd07] Erdman, A. R.: *Is Hydroxocobalamin Safe and Effective for Smoke Inhalation? Searching for Guidance in the Haze*. Annals of Emergency Medicine, 49:814–816, 2007.
- [ESSZ76] Elving, P. J., C. O. Schmakel, K. S. V. Santhanam und P. Zuman: *Nicotinamide-Nad Sequence: Redox Processes and Related Behavior: Behavior and Properties of Intermediate and Final Products*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 6:1–67, 1976.
- [FDN06] Fisher, K., M. J. Dilworth und W. E. Newton: *Azotobacter Vinelandii Vanadium Nitrogenase: Formaldehyde Is a Product of Catalyzed HCN Reduction, and Excess Ammonia Arises Directly from Catalyzed Azide Reduction*. Biochemistry, 45:4190–4198, 2006.
- [FK05] Fernandez, R. F. und D. A. Kunz: *Bacterial Cyanide Oxygenase Is a Suite of Enzymes Catalyzing the Scavenging and Adventitious Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Growth Substrate*. Journal of Bacteriology, 187:6396–6402, 2005.
- [FKMv02] Filipović-Kovačević, Ž., M. Mikšaj und D. Šalamon: *Cyanide determination in fruit brandies by an amperometric biosensor with immobilised Saccharomyces cerevisiae*. European Food Research and Technology, 215:347–352, 2002.
- [Fle90] Fleming, I.: *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*. VCH, Weinheim, 1990.

- [Fon87] Fonong, T.: *Enzyme method for the spectrophotometric determination of micro-amounts of cyanide*. The Analyst, 112:1033–1035, 1987.
- [GCY⁺03] Gao, Q., X. Cui, F. Yang, Y. Ma und X. Yang: *Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system*. Biosensors and Bioelectronics, 19:277–282, 2003.
- [GD02] Gorton, L. und E. Domínguez: *Electrocatalytic oxidation of NAD(P)/H at mediator-modified electrodes*. Reviews in Molecular Biotechnology, 82:371–392, 2002.
- [ges] GESTIS-Stoffdatenbank. <http://biade.itrust.de/>.
- [GG99] Göller, K. und E. A. Galinski: *Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives*. Journal of Molecular Catalysis B, 7:37–45, 1999.
- [GL91] Groom, C. A. und J. H. T. Luong: *A flow through analysis biosensor system for cyanide*. Journal of Biotechnology, 21:161–172, 1991.
- [GLFMVP⁺00] González LaFuente, J. M., E. Fernández Martínez, J. A. Vicente Pérez, S. Fernández Fernández, A. J. Miranda Ordieres, J. E. Sánchez Uría, M. L. Fernández Sánchez und A. Sanz-Medel: *Differential-pulse voltammetric determination of low $\mu\text{g l}^{-1}$ cyanide levels using EDTA, Cu(II) and a hanging mercury drop electrode*. Analytica Chimica Acta, 410:135–142, 2000.
- [Gol02] Goldbach, Marc: *Bakterielle Cyanidasen aus Pseudomonaden für biosensorische Applikationen*. Diplomarbeit, Universität Bonn, Institut für Pharmazeutische Biologie, 2002.
- [Gor86] Gorton, L.: *Chemically Modified Electrodes for the Electrocatalytic Oxidation of Nicotinamide Coenzymes*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1, Physical Chemistry in Condensed Phases, 82:1245–1258, 1986.
- [GS88] Gamoh, K. und H. Sawamoto: *Determination of Cyanide Ion by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection*. Analytical Sciences, 4:665–666, 1988.
- [GSDO98] Gomes, M. T. S. R., A. A. F. Silva, A. C. Duarte und J. A. B. P. Oliveira: *Determination of cyanide in waste waters using a quartz crystal microbalance*. Sensors and Actuators B, 48:383–386, 1998.

- [HDB07] Hall, A. H., R. Dart und G. Bogdan: *Sodium Thiosulfate or Hydroxocobalamin for the Empiric Treatment of Cyanide Poisoning?* Annals of Emergency Medicine, 49:806–813, 2007.
- [Hei84] Heinze, J.: *Cyclovoltammetrie - die „Spektroskopie“ des Elektrochemikers*. Angewandte Chemie, 96:823–840, 1984.
- [HJH05] Harrington, J. M., S. B. Jones und R. D. Hancock: *Determination of formation constants for complexes of very high stability: $\log \beta_4$ for the $[\text{Pd}(\text{CN})_4]^{2-}$ ion*. Inorganica Chimica Acta, 358:4473–4480, 2005.
- [HK83] Harris, R. E. und C. J. Knowles: *The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of Pseudomonas fluorescens that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth*. FEMS Microbiology Letters, 20:337–341, 1983.
- [HL95] Hu, X. und Z. Leng: *Determination of Cyanide Using a Tyrosinase Amperometric Biosensor with Catechol as Substrate*. The Analyst, 120:1555–1557, 1995.
- [HS81] Huck, H. und H. Schmidt: *Chloranil als Katalysator zur elektrochemischen Oxidation von NADH zu NAD^+* . Angewandte Chemie, 93:421–422, 1981.
- [Huc82] Huck, H.: *Katalytische Oxidation von NADH an Graphitelektroden durch adsorbierte Phenoxazinderivate*. Fresenius Zeitschrift für analytische Chemie, 313:548–552, 1982.
- [IHN⁺96] Ikebukuro, K., M. Honda, K. Nakanishi, Y. Nomura, Y. Masuda, K. Yokoyama, Y. Yamauchi und I. Karube: *Flow-type cyanide sensor using an immobilized microorganism*. Electroanalysis, 8:876–879, 1996.
- [IHPG91] Ingvorsen, K., B. Højer-Pedersen und S. E. Godtfredsen: *Novel Cyanide-Hydrolyzing Enzyme from Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans*. Applied And Environmental Microbiology, 57:1783–1789, 1991.
- [IMC⁺96] Ikebukuro, K., A. Miyata, S. J. Cho, Y. Nomura, S. M. Chang, Y. Yamauchi, Y. Hasebe, S. Uchiyama und I. Karube: *Microbial cyanide sensor for monitoring river water*. Journal of Biotechnology, 48:73–80, 1996.
- [ISO⁺96] Ikebukuro, K., M. Shimomura, N. Onuma, A. Watanabe, Y. Nomura, K. Nakanishi, Y. Arikawa und I. Karube: *A novel biosensor system for*

- cyanide based on a chemiluminescence reaction*. *Analytica Chimica Acta*, 329:111–116, 1996.
- [Jae80] Jaegfeldt, H.: *Adsorption and electrochemical oxidation behaviour of NADH at a clean platinum electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 110:295–302, 1980.
- [JB05] Jander und Blasius: *Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum*. S. Hirzel Verlag Stuttgart, 15. Auflage, 2005.
- [JBM⁺03] Jandhyala, D., M. Berman, P. R. Meyers, B. T. Sewell, R. C. Willson und M. J. Benedik: *CynD, the Cyanide Dihydratase from Bacillus pumilus: Gene Cloning and Structural Studies*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:4794–4805, 2003.
- [JCFPSM04] Jin, W. J., J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro und A. Sanz-Medel: *Surface-modified CdSe quantum dots as luminescent probes for cyanide determination*. *Analytica Chimica Acta*, 522:1–8, 2004.
- [JWSB05] Jandhyala, D. M., R. C. Willson, B. T. Sewell und M. J. Benedik: *Comparison of cyanide-degrading nitrilases*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68:327–335, 2005.
- [Kav04] Kavanaugh, M.: *Cyanide Formation And Fate In Complex Effluents And Its Relation To Water Quality Criteria*. Water Environment Research Foundation, 2004.
- [KBT07] Kerns, W., M. Beuhler und C. Tomaszewski: *Hydroxocobalamin versus Thiosulfate for Cyanide Poisoning*. *Annals of Emergency Medicine*, 51:338–339, 2007.
- [Kau02] Keusgen, M.: *Biosensors: new approaches in drug discovery*. *Naturwissenschaften*, 89:433–444, 2002.
- [KFP01] Kunz, D. A., R. F. Fernandez und P. Parab: *Evidence That Bacterial Cyanide Oxygenase Is a Pterin-Dependent Hydroxylase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287:514–518, 2001.
- [KGK95] Karyakin, A. A., O. V. Gitelmacher und E. E. Kayakina: *Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose*. *Analytical Chemistry*, 67:2419–2423, 1995.
- [KJLL⁺03] Kao, C. M., J. K. J.K. Liu, H. R. Lou, C. S. Lin und S. C. Chen: *Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere*, 50:1055–1061, 2003.

- [KK99] Karyakin, A. A. und E. E. Karyakina: *Prussian Blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors.* Sensors and Actuators B, 57:268–273, 1999.
- [KKG96] Karyakin, A. A., E. E. Karyakina und L. Gorton: *Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis.* Talanta, 43:1597–1606, 1996.
- [KKG98] Karyakin, A. A., E. E. Karyakina und L. Gorton: *The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 456:97–104, 1998.
- [KKG99] Karyakin, A. A., E. E. Karyakina und L. Gorton: *On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes.* Electrochemistry Communications, 1:78–82, 1999.
- [KKK87] Kita, H., T. Katagiri und K. Kunimatsu: *Electrochemical Oxidation of HCOONa on Pt in Acidic Solutions.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 220:125–138, 1987.
- [KKK⁺04] Keusgen, M., J. P. Klock, D. T. Knobbe, M. Jünger, I. Krest, M. Goldbach, W. Klein und M. J. Schöning: *Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors.* Sensors and Actuators B, 103:380–385, 2004.
- [KKX09] Kelkar, R., E. C. Kinzel und X. Xu: *Laser sintering of conductive carbon paste on plastic substrate.* Optical Engineering, 48:074301.1–074301.5, 2009.
- [KMR⁺99] Katekawa, E., F. Maximiano, L. L. Rodrigues, M. F. Delbem und S. H. P. Serrano: *Electrochemical oxidation of NADH at a bare glassy carbon electrode in different supporting electrolytes.* Analytica Chimica Acta, 385:345–352, 1999.
- [KNK96] Kage, S., T. Nagata und K. Kudo: *Determination of cyanide and thiocyanate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 675:27–32, 1996.
- [KS53] Kirk, R. L. und N. S. Stenhouse: *Ability to smell Solutions of Potassium Cyanide.* Nature, 171:698–699, 1953.
- [KSM81] Kitani, A., Y. H. So und L. L. Miller: *An Electrochemical Study of the Kinetics of NADH Being Oxidized By Diamines Derived from Diaminobenzenes and Diaminopyrimidines.* Journal of the American Chemical Society, 103:7636–7641, 1981.

- [Kuh03] Kuhrmeyer, Kristina: *Charakterisierung bakterieller Cyanidasen aus Pseudomonaden für biosensorische Applikationen*. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2003.
- [LG92] Lippert, K. und E. A. Galinski: *Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying*. Applied Microbiology and Biotechnology, 37:61–65, 1992.
- [LGO04] Lindsay, A. E., A. R. Greenbaum und D. O'Hare: *Analytical techniques for cyanide in blood and published blood cyanide concentrations from healthy subjects and fire victims*. Analytica Chimica Acta, 511:185–195, 2004.
- [LK95] Lee, J. I. und I. Karube: *A novel microbial sensor for the determination of cyanide*. Analytica Chimica Acta, 313:69–74, 1995.
- [LK96a] Lee, J. I. und I. Karube: *Development of a biosensor for gaseous cyanide in solution*. Biosensors and Bioelectronics, 11:1147–1154, 1996.
- [LK96b] Lee, J. I. und I. Karube: *Reactor Type Sensor for Cyanide Using an Immobilized Microorganism*. Electroanalysis, 8:1117–1120, 1996.
- [LRS85] Lundquist, P., H. Rosling und B. Sörbo: *Determination of Cyanide in Whole Blood, Erythrocytes, and Plasma*. Clinical Chemistry, 31:591–595, 1985.
- [MA02] Mirmohseni, A. und A. Alipour: *Construction of a sensor for the determination of cyanide in industrial effluents: a method based on quartz crystal microbalance*. Sensors and Actuators B, 84:245–251, 2002.
- [MBFA99] Merkoçi, A., S. Braga, E. Fàbregas und S. Alegret: *A potentiometric biosensor for D-amygdalin based on a consolidated biocomposite membrane*. Analytica Chimica Acta, 391:65–72, 1999.
- [MCM02] Miyakawa, S., H. J. Cleaves und S. L. Miller: *The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide*. Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 32:195–208, 2002.
- [ME78] Moiroux, J. und P. J. Elving: *Effects of Adsorption, Electrode Material, and Operational Variables on the Oxidation of Dihydropyridine Adenine Dinucleotide at Carbon Electrodes*. Analytical Chemistry, 50:1056–1062, 1978.

- [MLT⁺05] Mak, K. K. W., A. W. C. Law, S. Tokuda, H. Yanase und R. Renneberg: *Application of cyanide hydrolase from Klebsiella sp. in a biosensor system for the detection of low-level cyanide*. Applied Microbiology and Biotechnology, 67:631–636, 2005.
- [MMS77] Mattiasson, B., K. Mosbach und A. Svenson: *Application of cyanide-metabolizing enzymes to environmental control; enzyme thermistor assay of cyanide using immobilized rhodanese and injectase*. Biotechnology and Bioengineering, 19:1643–1651, 1977.
- [MPFL⁺07] Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan und R. Fernandez-Lafuente: *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology, 40:1451–1463, 2007.
- [MRBSM96] Molina, F., A. Rueda, J. M. Bosque-Sendra und L. Megias: *Determination of proteins in the presence of imidazole buffers*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14:273–280, 1996.
- [MRWL93] Meyers, P. R., D. E. Rawlings, D. R. Woods und G. G. Lindsey: *Isolation and Characterization of a Cyanide Dihydratase from Bacillus pumilus C1*. Journal of Bacteriology, 175:6105–6112, 1993.
- [MVC07] Mousty, C., L. Vieille und S. Cosnier: *Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 22:1733–1738, 2007.
- [MWS95] McMahon, J. M., W. L. B. White und R. T. Sayre: *Cyanogenesis in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. Journal of Experimental Botany, 46:731–741, 1995.
- [MWSR03] Mak, K. K. W., U. Wollenberger, F. W. Scheller und R. Renneberg: *An amperometric bi-enzyme sensor for determination of formate using cofactor regeneration*. Biosensors and Bioelectronics, 18:1095–1100, 2003.
- [MYR05a] Mak, K. K. W., H. Yanase und R. Renneberg: *Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 20:2581–2593, 2005.
- [MYR05b] Mak, K. K. W., H. Yanase und R. Renneberg: *Novel Optical Biotest for Determination of Cyanide Traces in Marine Fish Using Microbial Cyanide Hydratase and Formate Dehydrogenase*. Microchimica Acta, 149:131–135, 2005.
- [Nei03] Neitzel, Volkmar: *Bestimmungsgrenze ist nicht gleich Bestimmungsgrenze*. CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 54:248–251, 2003.

- [NGC⁺07] Nagasawa, H. T., D. J. W. Goon, D. L. Crankshaw, R Vince und S. E. Patterson: *Novel, Orally Effective Cyanide Antidotes*. Journal of Medicinal Chemistry, 50:6462–6464, 2007.
- [NII96] Nakanishi, K., K. Ikebukuro und Karube I.: *Determination of cyanide using a microbial sensor*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 60:97–106, 1996.
- [NK03] Nakamura, H. und I. Karube: *Current research activity in biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377:446–468, 2003.
- [NKG95] Nagy, G., I. Kapui und L. Gorton: *Effect of surface-active agents on amperometric NADH measurements with chemically modified electrodes*. Analytica Chimica Acta, 305:65–73, 1995.
- [NN93] Nagy, A. und G. Nagy: *Amperometric air gap cell for the measurement of free cyanide*. Analytica Chimica Acta, 283:795–802, 1993.
- [OIK⁺03] Omura, H., M. Ikemoto, M. Kobayashi, S. Shimizu, T. Yoshida und T. Nagasawa: *Purification, Characterization and Gene Cloning of Thermostable O-Acetyl-L-Homoserine Sulfhydrylase Forming γ -Cyano- α -Aminobutyric Acid*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 96:53–58, 2003.
- [OT03] O'Reilly, C. und P. D. Turner: *The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes – a comparative study*. Journal of Applied Microbiology, 95:1161–1174, 2003.
- [Pea63] Pearson, R. G.: *Hard and Soft Acids and Bases*. Journal of the American Chemical Society, 85:3533–3539, 1963.
- [Pic85] Pickering, W. G.: *Cyanide toxicity and the hazards of dicobalt edetate*. British Medical Journal, 291:1644, 1985.
- [PIS97] Park, T. M., E. I. Iwuoha und M. R. Smyth: *Development of a sol-gel enzyme inhibition-based amperometric biosensor for cyanide*. Electroanalysis, 9:1120–1123, 1997.
- [PK80] Pihlar, B. und L. Kosta: *Determination of cyanides by continuous distillation and flow analysis with cylindrical amperometric electrodes*. Analytica Chimica Acta, 114:275–281, 1980.
- [PLG⁺93] Persson, B., H. L. Lan, L. Gorton, Y. Okamoto, P. D. Hale, L. I. Boguslavsky und T. Skotheim: *Amperometric biosensors based on electrocatalytic regeneration of NAD⁺ at redox polymer-modified electrodes*. Biosensors and Bioelectronics, 8:81–88, 1993.

- [Pou90] Poulton, J. E.: *Cyanogenesis in Plants*. Plant Physiology, 94:401–405, 1990.
- [Ray92] Raybuck, S. A.: *Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation*. Biodegradation, 3:3–18, 1992.
- [RC09] Radoi, A. und D. Compagnone: *Recent advances in NADH electrochemical sensing design*. Bioelectrochemistry, 76:126–134, 2009.
- [RK08] Rauber, C. und H. Kupferschmidt: *Vergiftungen durch Zyanide*. Schweizerisches Toxikologisches Informationszentrum, 2008.
- [RYM⁺99] Rao, T. N., I. Yagi, T. Miwa, D. A. Tryk und A. Fujishima: *Electrochemical Oxidation of NADH at Highly Boron-Doped Diamond Electrodes*. Analytical Chemistry, 71:2506–2511, 1999.
- [San99] Sander, R.: *Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3)*, 1999. <http://www.henrys-law.org>.
- [SBM⁺03] Sewell, B. T., M. N. Berman, P. R. Meyers, D. Jandhyala und M. J. Benedik: *The Cyanide Degrading Nitrilase from Pseudomonas stutzeri AK61 Is a Two-Fold Symmetric, 14-Subunit Spiral*. Structure, 11:1413–1422, 2003.
- [SC90] Smit, M. H. und A. E. G. Cam: *Cyanide Detection Using a Substrate-Regenerating, Peroxidase-Based Biosensor*. Analytical Chemistry, 62:2429–2436, 1990.
- [SCM04] Shan, D., S. Cosnier und C. Mousty: *HRP/[Zn–Cr–ABTS] redox clay-based biosensor: design and optimization for cyanide detection*. Biosensors and Bioelectronics, 20:390–396, 2004.
- [SCS⁺01] Sandström, K. J. M., R. Carlson, A. Sunesson, J. Levin und A. P. F. Turner: *Multivariate evaluation of factors influencing the performance of a formic acid biosensor for use in air monitoring*. Analyst, 126:2008–2014, 2001.
- [SM64] Sillén, L. G. und A. E. Martell: *Stability constants of metal-ion complexes*. Royal Society of Chemistry, 1964.
- [SM01] Smith, M. B. und J. March: *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*. Wiley, New York, 2001.
- [SMC04] Shan, D., C. Mousty und S. Cosnier: *Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors*. Analytical Chemistry, 76:178–183, 2004.

- [SNS⁺00] Sandström, K. J. M., J. Newman, A. Sunesson, J. Levin und A. P. F. Turner: *Amperometric biosensor for formic acid in air*. Sensors and Actuators B, 70:182–187, 2000.
- [SR93] Smit, M. H. und G. A. Rechnitz: *Toxin Detection Using a Tyrosinase-Coupled Oxygen Electrode*. Analytical Chemistry, 65:300–305, 1993.
- [SSLT03] Sandström, K. J. M., A. Sunesson, J. Levin und A. P. F. Turner: *A gas-phase biosensor for environmental monitoring of formic acid: laboratory and field validation*. Journal of Environmental Monitoring, 5:477–482, 2003.
- [SWWL01] Scheller, F. W., U. Wollenberger, A. Warsinke und F. Lisdat: *Research and development in biosensors*. Current Opinion in Biotechnology, 12:35–40, 2001.
- [TKC⁺07] Turek, M., L. Ketterer, M. Claßen, H. K. Berndt, G. Elbers, P. Krüger, M. Keusgen und M. J. Schöning: *Development and Electrochemical Investigations on an EIS- (electrolyte-insulator-semiconductor) based Biosensor for Cyanide Detection*. Sensors, 7:1415–1426, 2007.
- [TM05] Tishkov, A. A. und H. Mayr: *Die ambidente Reaktivität des Cyanid-Ions: ein Versagen des HSAB-Prinzips*. Angewandte Chemie, 117:145–148, 2005.
- [TNC⁺02] Tagari, M., R. Newman, M. Chagoyen, J. M. Carazo und K. Henrick: *New electron microscopy database and deposition system*. Trends in Biochemical Sciences, 27:589, 2002. <http://www.emdatabank.org>.
- [TO96] Tatsuma, T. und N. Oyama: *H₂O₂-Generating Peroxidase Electrodes as Reagentless Cyanide Sensors*. Analytical Chemistry, 68:1612–1615, 1996.
- [TTDW99] Thevenot, D. R., K. Tóth, R. A. Durst und G. S. Wilson: *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. Pure and Applied Chemistry, 71:2333–2348, 1999.
- [TTTI84] Toida, T., T. Togawa, S. Tanabe und T. Imanari: *Determination of cyanide and thiocyanate in blood plasma and red cells by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 308:133–141, 1984.
- [Tur10] Turek, M.: *Nachweis von Cyanid und Schwermetallen mittels Chip-basierter Chemo- und Biosensoren*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2010.

- [VAB⁺03] Vasilescu, A., S. Andreescu, C. Bala, S. C. Litescu, T. Noguer und J. L. Marty: *Screen-printed electrodes with electropolymerized Meldola Blue as versatile detectors in biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 18:781–790, 2003.
- [VAS74] Valentour, J. C., V. Aggarwal und I. Sunshine: *Sensitive gas chromatographic determination of cyanide*. Analytical Chemistry, 46:924–925, 1974.
- [VDG⁺07] Viry, L., A. Derré, P. Garrigue, N. Sojic, P. Poulin und A. Kuhn: *Optimized carbon nanotube fiber microelectrodes as potential analytical tools*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389:499–505, 2007.
- [Vet00] Vetter, J.: *Plant cyanogenic glykosides*. Toxicon, 38:11–36, 2000.
- [VK98] Volotovskiy, V. und N. Kim: *Cyanide determination by an ISFET-based peroxidase biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 13:1029–1033, 1998.
- [Vog08] Vogt, Anja: *Untersuchungen zu Schwefelverbindungen und Enzymaktivitäten in Allium-Arten des Subgenus Melanocrommyum*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2008.
- [WA98] Weissemel, K. und H. J. Arpe: *Industrielle Organische Chemie, Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte*. Wiley-VCH, Weinheim, 5. Auflage, 1998.
- [WAM92] Wang, J., L. Angnes und T. Martinez: *Scanning tunneling microscopic probing of surface fouling during the oxidation of nicotinamide coenzymes*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 29:215–221, 1992.
- [Way84] Way, J. L.: *Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 24:451–481, 1984.
- [WHO08] WHO: *Guidelines for Drinking-water Quality, third edition, incorporating first and second addenda*. World Health Organization, 2008.
- [Wib07] Wiberg, N.: *Holleman Wiberg: Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 102. Auflage, 2007.
- [WL88] Wang, J. und M. S. Lin: *In Situ Electrochemical Renewal of Glassy Carbon Electrodes*. Analytical Chemistry, 60:499–502, 1988.
- [WTL⁺98] Wang, J., B. Tian, J. Lu, D. MacDonald, J. Wang und D. Luo: *Renewable-Reagent Enzyme Inhibition Sensor for Remote Monitoring of Cyanide*. Electroanalysis, 10:1034–1037, 1998.

- [WYIK98a] Watanabe, A., K. Yano, K. Ikebukuro und I. Karube: *Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from Pseudomonas stutzeri AK61*. Applied Microbiology and Biotechnology, 50:93–97, 1998.
- [WYIK98b] Watanabe, A., K. Yano, K. Ikebukuro und I. Karube: *Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, Pseudomonas stutzeri AK61, by cyanidase*. Microbiology, 144:1677–1682, 1998.
- [WYIK98c] Watanabe, A., K. Yano, K. Ikebukuro und I. Karube: *Investigation of the potential active site of a cyanide dihydratase using site-directed mutagenesis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1382:1–4, 1998.
- [YHL87] Yon Hin, B. F. Y. und C. R. Lowe: *Catalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide at Hexacyanoferrate-Modified Nickel Electrodes*. Analytical Chemistry, 59:2111–2115, 1987.
- [YJ95] Young, C. A. und T. S. Jordan: *Cyanide Remediation: Current and Past Technologies*. In: *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*, Seiten 104–128, 1995.
- [ZYAW02] Zhao, H., Y. Yuan, S. Adeloju und G. G. Wallace: *Study on the formation of the Prussian blue films on the polypyrrole surface as a potential mediator system for biosensing applications*. Analytica Chimica Acta, 472:113–121, 2002.

Lebenslauf

Lothar Rudolf Ketterer

Adresse Weidenhäuser Straße 97
35037 Marburg

Geburtsdatum 27. Januar 1976

Geburtsort Offenburg

Staatsangehörigkeit Deutsch

Ausbildung und Berufspraxis

06/1995	Abitur, Leistungskurse: Chemie, Englisch
07/1995 - 07/1996	Zivildienst, Rotes Kreuz Rettungsdienst, Kreisverband Bühl
10/1996 - 10/2001	Studium der Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
11/2001 - 04/2002	Pharmaziepraktikum, Oberstadt Apotheke, 77855 Achern
05/2002 - 10/2002	Pharmaziepraktikum, Spitzner Arzneimittel, 76275 Ettlingen
12/2002	Approbation zum Apotheker
04/2003 - 01/2004	Angestellter Apotheker, Mörike Apotheke, 74321 Bietigheim-Bissingen
seit 02/2004	Arbeit an der Dissertation, Thema: Entwicklung eines amperometrischen Biosensors für Cyanid, AG Prof. Dr. Keusgen
02/2004 - 07/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Beschäftigungsort: Marburg) Betreuung des Studentenpraktikums „Instrumentelle Analytik“
08/2005 - 01/2010	Wissenschaftlicher Angestellter, Philipps-Universität Marburg Weiterführung der Betreuung des Studentenpraktikums, ab 05/2006 als Organisatorischer Leiter
04/2006 - 02/2008	Ergänzungsstudiengang Informatik, Philipps-Universität Marburg